

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización de los stocks fenotípicos del mejillón
(*Mytilus edulis*) cultivados y naturales del Chubut: hacia el
desarrollo de una herramienta para la trazabilidad del
producto comercial**

Por

María Magdalena Trivellini

Director: Dr. Federico Márquez

Directora: Dra. Silvina Van der Molen



**Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Instituto de Biología de Organismos Marinos**



Universidad
Nacional
de Córdoba

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2019

COMISIÓN ASESORA

Dr. Federico Márquez; IBIOMAR - CENPAT- CONICET

Dr. Gustavo Darrigran, Universidad Nacional de la Plata - CONICET

Dra. María Carla de Aranzamendi, Universidad Nacional de Córdoba

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

A toda mi Familia...

*... especialmente a Maty, Vera y Lupe por
el tiempo robado.*

Agradecimientos

Son muchas las personas que ayudaron en estos años, tanto en el trabajo, en lo académico y sobre todo en lo personal, ya que para una persona insegura y con crisis de confianza y vocación recurrentes, el apoyo y la confianza del entorno son fundamentales.

Voy a empezar agradeciendo a mi familia, a TODA mi familia. Siempre estuvieron apoyándome, sin ellos no hubiera llegado a Puerto Madryn. Siempre alentándome, confiando en mí de una manera única. Son un pilar fundamental en mí vida, necesarios en cada momento, ustedes y los adicionales que llegaron después (cuñada, cuñados, sobrinos, etc).

Que decir de MI familia: Maty, Vera y Lupe...completaron mi vida. Como dice Drexler en una de sus canciones: *"Yo también pensaba que era feliz antes, pero no entiendo cómo podía vivir antes"*. Con ustedes soy la Magda genuina, la que siempre quise ser. Los amo y los voy a amar toda la vida. No me canso de agradecer el tenerlos conmigo. Maty, sos un hombre increíble, gracias por elegirme y hacerme sentir especial todo el tiempo.

A mis directores, con quienes tengo una relación más allá de lo laboral. Gracias por haber confiado en mí para este trabajo. Gracias por el apoyo incondicional en todo. Si hay algo que valoro es la comodidad con la que siempre pude hablar, sin sentir miedo a equivocarme. Fede vos me vas a seguir sufriendo en el posdoc, seguro vamos a seguir siendo buen equipo. Sil, un placer haber compartido estos años, gracias.

A mis amistades de aquí y de allá, a los de siempre y a los recién llegados:

... Pitu, Ana, Tincho, Colo, Moro, Cruz, Vero, Yani, Pau y sus familias. Gracias por tantos años de amistad, con ustedes se hizo más fácil el estar lejos de mi familia.

...Lu, Cin, Rusa, Anto, Gise, Pau, Carla. Cuantos lindos momentos tenemos juntas, obviamente siempre mediante alguna comida o bebida, así somos, jaja.

...Lau, mi compañera de oficina, que más de una vez fuimos más psicólogas la una de la otra que compañeras.

...Ceci, mi primamiga. Sos incondicional, amo la relación que tenemos, más allá de la familia, Te quiero al cielo.

...Jime, Emi, Nani, Lalo. Amigos que perduran de mi paso por la universidad de bahía, que lindo es tenerlos.

...Mauri, Joa, y la recién llegada: Helena. En poquito tiempo fusionamos a nuestras familias de una manera muy armónica y hermosa. Los disfruto mucho.

Saliendo un poco de lo familiar, esta tesis no habría sido posible sin el apoyo y la colaboración de los productores que aportaron, además de los mejillones sobre los que desarrollé este proyecto, toda su logística, experiencia e información. Cada vez que necesité algo, ahí estuvieron. Ojalá los resultados de esta tesis sean un punto de partida para el desarrollo de una denominación de origen o marca registrada de sus productos, ayudando a generar mayor valor agregado. GRACIAS infinitas: Gloria Mariño del Riacho San José; Stephane Sorroche de Granja Marina San Julián; Agustín (docente) y Jorge (vicedirector) y a todo el equipo de la escuela N° 721 de Camarones; Hernan Marraco de Agencia Comodoro Conocimiento; Claudia Cano (docente) y Renato Frías de la escuela N° 704 de Comodoro Rivadavia. Gracias Luis Filun por la dedicación y el interés en que lleguen las valvas de Chile.

Gracias por los aportes y consejos a Nicolás Ortiz y Cesar Gentile.

Además, esta tesis fue posible gracias al aporte económico de los proyectos PIP1122015 0100241 CO, CIUMPAT RES. R/8. 2015 y de la beca obtenida por la Red de Fortalecimiento para la Maricultura Patagónica.

No me puedo olvidar del acompañamiento de la comisión asesora durante todo el doctorado: Gustavo, Carla y Fede. Gracias por el apoyo, los aportes y comentarios respecto de la tesis y de la vida, ya que con dos embarazos durante el doctorado, las charlas a veces se derivaban hacia rumbos no académicos.

Para terminar esta sección, quiero dejar explícito mi deseo de que la ciencia y la tecnología vuelvan a ser de interés para el gobierno nacional, entendiendo que sin invertir en este sector (entre otros) es difícil que el país progrese.

Listado de publicaciones derivadas de la tesis

Las siguientes publicaciones se corresponden de manera directa con los resultados de esta tesis o con sus componentes teóricos y metodológicos.

- **Trivellini María Magdalena**, Van der Molen Silvina y Márquez Federico. 2018. Fluctuating asymmetry in the Shell shape of the Atlantic Patagonian mussel, *Mytilus platensis*, generated by habitat-specific constraints. *Hydrobiologia* 822(1), 189-201. 10.1007/s10750-018-3679-8

- Márquez Federico, **Trivellini María Magdalena** y Van der Molen Silvina (2017). Use of shell shape variation as an assessment tool in the southernmost razor clam fishery. *Fisheries Research*. 186, 216-222.

Tabla de contenidos

Resumen	1
Abstract.....	4
Guía para la lectura de la tesis.....	7
Introducción General	10
Estado de la acuicultura mundial y su contexto provincial	11
Cultivo de Mejillón.....	13
Aspectos generales del Mejillón.....	14
Morfometría Geométrica	18
Trazabilidad y Denominación de Origen (DOI)	20
Objetivos.....	22
Objetivo general	23
Objetivos particulares.....	23
Metodología General.....	24
Sitios de muestreo	25
Muestreos.....	28
Bancos naturales.....	28
Cultivos	29
Laboratorio	31
Obtención de las imágenes.....	31
Digitalización y obtención de variables de forma.....	32
Capítulo 1: Descripción de la forma de la valva del mejillón (<i>M. edulis</i>) de bancos naturales y cultivados de cada una de las zonas productivas de la provincia de Chubut	35
1.1 Introducción.....	36
1.2 Materiales y Métodos	44

1.3 Resultados.....	48
1.4 Discusión.....	59
Capítulo 2: Comparación morfológica de las valvas del mejillón del Chubut entre localidades y hábitats	66
2.1 Introducción.....	67
2.2 Materiales y Métodos	71
2.2.1 Descripción de los sitios de muestreo	71
2.2.2 Análisis estadísticos	75
- Sobre la forma.	75
- Sobre las variables ambientales y su relación con la forma.	76
2.3 Resultados.....	78
2.3.1 Sobre la forma	78
2.3.2 Sobre las variables ambientales y su relación con la forma	93
2.4 Discusión.....	96
Capítulo 3: Cálculos de los índices de condición y rendimiento en tres localidades de la provincia de Chubut.....	103
3.1 Introducción.....	104
3.2 Materiales y Métodos	107
3.2.1 Sobre el peso de la valva	107
3.2.2 Sobre los índices de condición.....	108
3.2.3 Sobre las densidades	109
3.3 Resultados.....	109
3.3.1 Sobre el peso de la valva	109
3.3.2 Sobre los índices de condición.....	110

3.3.3 Sobre las densidades	113
3.4 DISCUSIÓN	115
Capítulo 4: Uso de la variación de la forma de la valva del mejillón para distinguir entre el mejillón chubutense y el chileno.....	121
4.1 Introducción.....	122
4.2 Materiales y Métodos	124
4.3 Resultados.....	127
4.4 Discusión.....	135
Conclusiones	139
Bibliografía.....	142

Resumen

En Patagonia existe un gran interés para que la miticultura logre su lugar en la industria nacional; una de las iniciativas para lograr este objetivo fue crear en diciembre del año 2011 la Red de Fortalecimiento para la Maricultura Costera Patagónica, que abarca las cuatro provincias patagónicas. En la provincia de Chubut existen varios proyectos de cultivo de mejillón, algunos experimentales y otros ya asentados, y se plantea la problemática de cómo generar marcas registradas de los productos acuícolas que permitan generar valor económico agregado. Una particularidad de las costas de Chubut es la coexistencia de sitios de acuicultura y poblaciones naturales de mejillones creciendo en diferentes condiciones ambientales, lo cual proporciona un escenario único para abordar estudios morfométricos comparativos. La caracterización de las variaciones de la forma de los mejillones de distintas zonas productivas, así como la diferenciación entre *stocks* cultivados y naturales podría ser utilizada como medida de control pesquero que permita conocer la procedencia del producto. Así, el objetivo general de esta tesis fue comparar la variación morfológica del mejillón (*Mytilus edulis*) de las zonas productivas de la provincia del Chubut y determinar si estas diferencias pueden ser utilizadas como herramientas para el seguimiento de la trazabilidad de los productos pesqueros. Además, se puso a prueba si las cicatrices de los músculos y el contorno externo de la valva representan módulos independientes; se comprobó también la presencia de asimetría fluctuante (como estimador de estrés ambiental) y si existen o no diferencias en los índices de condición entre los mejillones que habitan dos ambientes contrastantes como lo son los bancos naturales intermareales y los cultivos submareales. Por último, se realizaron comparaciones con mejillones importados de Chile con el fin de poder determinar la procedencia del producto a través de la forma de la valva. Para ello, se colectaron un total de 2.438 mejillones de los cuales, en promedio, fueron digitalizados 100 mejillones por hábitat y por localidad, lo que resultó en un total de 783 mejillones digitalizados. Se capturó la forma interna y externa de la valva mediante técnicas de morfometría geométrica y se emplearon diferentes análisis estadísticos multivariados para analizar los datos. Los resultados obtenidos muestran que los mejillones chubutenses son morfométricamente distintos entre sí, según el hábitat (banco

natural/cultivo) o la localidad (Riachos San José, Bahía Camarones, Comodoro Rivadavia) donde se desarrollan. El mejillón chubutense presentó dos módulos morfológicos independientes, uno interno que hace referencia a las partes blandas y otro externo que engloba al contorno de la valva; el módulo externo produjo los mayores porcentajes de asignación correcta a los grupos cuando se lo utilizó para comparar entre estos. De modo general, los mejillones de los bancos naturales tuvieron músculos aductores más desarrollados (módulo interno) y valvas triangulares y elongadas (módulo externo), mientras que la forma de la valva para los mejillones de los cultivos fueron más globosas. Además, los mejillones procedentes de los bancos naturales presentaron mayores niveles de asimetría fluctuante que los de los cultivos submareales. Respecto de los índices de condición, fueron los mejillones procedentes de los cultivos los que mostraron mayores valores. El mejillón chubutense y el mejillón chileno presentaron diferencias de forma de las valvas asociadas al país de origen de las muestras. Cabe destacar que no se logró separar al módulo interno del externo en el mejillón chileno, y esto podría deberse a que corresponde a una especie distinta (*M. chilensis*). Las condiciones ambientales tienen un impacto importante tanto en las partes blandas de los mejillones (en el crecimiento, la reproducción y por lo tanto en los índices de condición) como en la morfología de la valva. El mejillón patagónico es una especie ecológica y comercialmente relevante y, por lo tanto, es importante conocer los patrones de variación de forma que desarrolla en los distintos tipos de hábitats. En esta tesis se propone utilizar la variación en la forma de la valva como biomarcadora de la procedencia de los mejillones del Chubut.

Abstract

In Patagonia there is a great interest for miticulture to achieve its place in the national industry; one of the initiatives to achieve this objective was to create in December 2011 the “*Red de Fortalecimiento para la Maricultura Costera Patagónica*”, which covers the four Patagonian provinces. In Chubut province there are several projects, some experimental and others already settled mussel, and the problem is how to generate trademarks of aquaculture products that generate added economic value. A peculiarity of the Chubut coasts is the coexistence of aquaculture sites and natural populations of mussels growing in different environmental conditions, which provides a unique scenario to address comparative morphometric studies. The mussels shape variations characterization of different productive zones, as well as the differentiation between cultured and natural stocks could be used as a measure of fishing control that allows knowing the origin of the product. Thus, the general objective of this thesis was to compare the morphological variation of the mussel (*Mytilus edulis*) from the productive areas of Chubut province and to determine if these differences can be used as tools for the fishery products traceability. In addition, it was tested whether the scars of the muscles and the shells’ external contour represent independent modules; the presence of fluctuating asymmetry (as an estimator of environmental stress) was also verified and also whether or not there are differences in the condition indices between the mussels that inhabit two contrasting environments, such as intertidal wild areas and subtidal longlines. Finally, comparisons were made with mussels imported from Chile in order to determine the origin of the product through the shells’ shape. To do this, a total of 2,438 mussels were collected, of which on average 100 mussels were digitized by habitat and by location, which resulted in a total of 783 digitized mussels. The internal and external shape of the shell was captured by geometric morphometric techniques and different multivariate statistical analyzes were used to analyze the data. The results obtained show that the Chubut mussels are morphometrically different from each other according to the habitat (intertidal rocky shore /subtidal culture) or the locality (Riacho San José, Bahía Camarones, Comodoro Rivadavia). The Chubut mussel presented two independent morphological modules, one internal that refers to the soft parts and

other external that encompasses the contour of the shell; the external module produced the highest percentages of correct allocation to the groups, when it was used to compare them. In general, the mussels of the intertidal rocky shores had more developed adductor muscles (internal module) and triangular and elongated valves (external module), while the shape of the valve for the mussels of the cultures were more globose. In addition, mussels from intertidal rocky shores showed higher levels of fluctuating asymmetry than those from subtidal longlines. Regarding the condition index, the cultured mussels showed the highest values. The Chubut mussel and the Chilean mussel showed differences in the shell shape associated with the country of origin of the samples. It is worth mentioning that it was not possible to separate the internal module from the external one in the Chilean mussel, and this could be due to the fact that it corresponds to a different species (*M. chilensis*). The environmental conditions have an important impact on both the soft parts of the mussels (in growth, reproduction and therefore in the condition index) and in the shell morphology. The Patagonian mussel is an ecologically and commercially relevant species and therefore it is important to know the patterns of form variation that develops in different types of habitats. In this thesis it is proposed to use the shell shape variation as biomarker of the origin of the mussels of Chubut.

Guía para la lectura de la tesis

Esta tesis de doctorado comienza con una Introducción General en donde se explicitan generalidades de la temática, el marco teórico en el cual se basa el estudio y los objetivos del mismo. A lo largo de todo el manuscrito el término “localidades” lo utilizaré para hacer referencia a Riacho San José, Bahía Camarones y Comodoro Rivadavia; con “hábitat” me referiré a banco natural o cultivo muestreado dentro de cada localidad, y por último con “sitio” haré referencia a la interacción de ambas categorías. La descripción de los sitios de muestreo y los diferentes protocolos empleados hasta la obtención de las variables de forma se describen por única vez en la sección Metodología General. Luego, la tesis está organizada en 4 capítulos, todos con el mismo formato: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. Las referencias citadas a lo largo de la tesis se compilan en una única sección al final de la misma denominada Bibliografía. El orden en que se presentan los capítulos representa el orden lógico en que fueron surgiendo las preguntas que motivaron esta tesis doctoral: 1) ¿Cómo es la variación de la forma de la valva del mejillón chubutense y cuáles son los procesos biológicos que la generan?, 2) ¿Es posible determinar la procedencia de los individuos de mejillones a partir de la forma de sus valvas? y a su vez ¿se puede pensar a la morfometría geométrica como una herramienta de control pesquero?, 3) ¿Los mejillones de cultivo tienen índices de condición mayores que los mejillones procedentes de bancos naturales?, y por último 4) ¿Son distintas las formas de valvas de los mejillones de Chile de los mejillones chubutenses? Así, se encontrará en el **Capítulo 1** una descripción del morfoespacio de la valva del mejillón chubutense y el estudio de los principales procesos biológicos (alometría, modularidad y simetría) involucrados en la variación de la forma en la valva. En el **Capítulo 2** se logra discriminar, utilizando la forma de la valva, a mejillones de las diferentes localidades muestreadas y de los diferentes hábitats (banco natural vs cultivo) y su relación con las variables ambientales, proponiendo la implementación de la morfometría geométrica como herramienta para desarrollar un sistema económico y de fácil reconocimiento de la procedencia de los individuos. En el **Capítulo 3** se distingue a los mejillones que crecen en bancos naturales y en cultivos, utilizando tres índices de condición y el rendimiento en carne. Por último, en el **Capítulo 4**

fue posible distinguir al mejillón chubutense del mejillón importado de Chile utilizando a la forma de la valva.

Finalmente, se presentan las conclusiones generales que buscan resumir y destacar las principales contribuciones de esta tesis, se mencionan a su vez potenciales líneas de trabajo, y se destaca la utilización de la morfometría geométrica como herramienta de control pesquero.

Introducción General

Estado de la acuicultura mundial y su contexto provincial

Mundialmente, la acuicultura está creciendo más rápido que otros sectores de producción de alimentos; el consumo de bivalvos se promueve ampliamente por considerarlos productos alimenticios saludables y sostenibles y la demanda ha ido aumentando en los últimos años. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 59,6 millones de personas en todo el mundo encontraron una fuente de ingresos y medios de vida en los sectores de la pesca y la acuicultura durante el 2016 (FAO 2018). Mientras la proporción de personas que se dedicaban a la pesca de captura disminuyó un 20% desde 1990 a 2016, las que se dedicaban a la acuicultura aumentó del 17% al 32% (FAO 2018) en el mismo periodo. Chile fue en el 2016 el segundo mayor exportador de bivalvos a nivel mundial (FAO 2018), precedido por China. Por su parte, Argentina importa muchos de sus productos alimenticios, en el caso particular de la miticultura (cultivo de moluscos bivalvos de la familia Mitilidae, género *Mytilus*) los productos principalmente importados son el mejillón congelado y en conservas (SENASA 2018). En la actualidad esta industria presenta un gran dinamismo, por lo que es una oportunidad para generar empleo y negocios, tanto en pequeños como medianos y grandes productores; asimismo, se podría convertir en un factor relevante de subsistencia y desarrollo para comunidades costeras (www.argentina.gob.ar/agroindustria 2018).

En Argentina, la miticultura está en pleno proceso de desarrollo: en el 2002 no se alcanzaban las 50 toneladas, sin embargo para el año 2011 se produjeron 248 toneladas (CRIAR 2012). Este aumento en la producción puede deberse a que las diferentes formas de cultivar mejillones son muy accesibles para los pequeños productores pesqueros dado que requieren poca inversión en tecnología e infraestructura (cultivos extensivos). Además, los mejillones se alimentan en el primer eslabón de la cadena trófica y son una fuente relativamente económica de proteína animal saludable con altos niveles de ácidos grasos esenciales, comparada con peces y crustáceos (Lovatelli *et al.* 2008). En el año 2012, se creó la Coordinación de Promoción del Consumo de Recursos Vivos del Mar dependiente de la Dirección Nacional de Planificación Pesquera (Lovatelli *et al.* 2008;

www.argentina.gob.ar/agroindustria 2018) con el fin de estimular el consumo de productos de mar y, de esta manera, ayudar al sector de la acuicultura en la región para su expansión y proporcionar oportunidades de empleo y de negocios.

La provincia de Chubut no es ajena a este incremento en el interés productivo de la acuicultura y esto queda de manifiesto desde el año 2012, cuando se realizó el quinto taller de trabajo de la Red de Fortalecimiento para la Maricultura Costera Patagónica (RMCP) y un Taller de cultivo de mejillones. En dicho encuentro se expusieron y debatieron problemas y soluciones actuales y futuros referidos a formas de cultivo, manejo sustentable del recurso pesquero, políticas de manejo, proyectos de cultivo y repoblamiento, entre otras cuestiones. Además, durante el año 2013 SENASA reconoció la clasificación de categoría A de tres áreas de la provincia con gran potencial para el desarrollo de la maricultura: Puerto Lobos, Bahía Camarones y Playa Belvedere (SENASA 2013). Asimismo, en la provincia existen parajes, como la comunidad de Riacho San José en el golfo homónimo, en donde desde hace 40 años los pescadores artesanales extraen mejillones de los bancos naturales (Santa Ana 2004). Desde hace años los pescadores artesanales vienen notando una disminución de la abundancia de estos bancos naturales y por ello, en la actualidad, hay un proyecto de repoblamiento que aprovecha la captación de semillas en los bancos intermareales (RMCP: 5º Taller de Trabajo de la RMCP y Taller de Cultivo de Mejillón, 2012; (www.argentina.gob.ar/agroindustria 2018)). En este golfo también existen emprendimientos privados dedicados a la captación y comercialización de semilla. Adicionalmente, en la zona de Bahía Camarones y de Comodoro Rivadavia existen productores de pequeña envergadura que apuestan a esta actividad. En la zona de Puerto Lobos, existe un consorcio formado por diez integrantes que se dedican a actividades de extracción y acuicultura (www.argentina.gob.ar/agroindustria 2018). Con estos desarrollos, sumados a algunas acciones del entorno gubernamental provincial que los motorizan, queda de manifiesto el interés que hay con respecto a la acuicultura en la provincia de Chubut por parte de empresarios pesqueros y pescadores artesanales, como así también por organismos nacionales como el CONICET a través de la Red de Maricultura (RMCP).

Cultivo de Mejillón

Existe una amplia variedad de métodos y estilos para realizar el cultivo del mejillón: balsas o bateas, *longlines* con aplicaciones sumergibles a diferentes profundidades y superficiales y *bouchots* franceses (estacas de madera con bolsas de red envueltas alrededor). Cada uno tiene sus ventajas y desventajas según la región y las características oceanográficas de la localidad. El tipo de sistema utilizado en la mayor parte de la provincia de Chubut debido a las particularidades de sus costas es el conocido como *longlines* (Brenner 2009; Gosling 2003; Lovatelli *et al.* 2008; www.argentina.gob.ar/agroindustria 2018). Es de destacar que en los distintos métodos de cultivo, los mejillones pueden estar expuestos a diferentes condiciones ambientales y, a su vez, crecer en condiciones ambientales distintas a las que se encontrarían en los bancos naturales (Cubillo *et al.* 2012a).

Las etapas en el cultivo de mejillón son las mismas independientemente del estilo empleado. Como primer paso se obtiene la semilla (captación), para esto se usan diferentes colectores según la localidad. En zonas de buena captación se dejan *longlines* como colectores de semillas en el submareal o colectores en los bancos naturales y, en otros casos, se compran semillas a criaderos o se colectan del banco natural más cercano. En el caso de contar con las instalaciones adecuadas para producir semilla en criadero (*hatchery*), se llevan reproductores de los bancos naturales al acuario para inducirlos a desovar. Luego, la semilla captada debe ser encordada (en el caso del cultivo en *longline*), proceso mediante el cual la semilla es colocada en las cuerdas de cultivo para su posterior engorde. A la etapa que abarca desde que las cuerdas con semillas son colocadas en el mar hasta que los individuos alcanzan 4-5 cm de longitud se la conoce como pre-engorde. Al cabo de unos meses, cuando las cuerdas alcanzan un peso considerable y los mejillones restringen su crecimiento debido a la alta densidad, se produce el desdoble, donde se rearmen nuevas cuerdas a menor densidad para darles a los mejillones más espacio para crecer hasta alcanzar la talla de cosecha demandada por el mercado (www.argentina.gob.ar/agroindustria 2018).

Aspectos generales del Mejillón

Los moluscos bivalvos son un componente importante de las comunidades intermareales y submareales. Las características biológicas y ecológicas de los mejillones han sido ampliamente estudiadas y existe bastante información sobre su reproducción, crecimiento, desarrollo larvario y épocas de fijación, entre otros aspectos (Bala 1989; Gosling 2003; Penchaszadeh 1974; Zaixso 2015). Desde el punto de vista morfológico, en líneas generales, las valvas tienen forma de cuña con el borde ventral casi recto y el borde dorsal convexo. En el lado externo presentan estrías de crecimiento, mientras que la superficie interna es nacarada donde se evidencian las improntas musculares (figura I).



Figura I Aspecto general de la valva de mejillón, mostrando el lado externo e interno.

El complejo de especies de *Mytilus edulis* está compuesto por *M. edulis* (Linnaeus, 1758), *M. galloprovincialis* (Lamarck, 1819) y *M. trossulus* (Gould, 1850) (McDonald *et al.* 1991). Todas estas especies se distribuyen en un amplio espectro de ambientes tanto en el hemisferio norte como en el sur (figura II). La taxonomía de los mejillones de la costa sudamericana está actualmente en discusión, como también si su origen es nativo o invasor

(McDonald *et al.* 1991; Westfall 2010). La distinción entre las especies del género *Mytilus* fue estudiada utilizando métodos morfométricos, bioquímicos y moleculares (Astorga *et al.* 2015; Gardner y Thompson 2009; Illesca *et al.* 2018; McDonald *et al.* 1991; Seed 1968; Toro 1998; Westfall y Gardner 2013). Según Gardner y Thompson (2009) *M. trossulus* estaría distribuido sólo en el hemisferio norte y *M. edulis* y *M. galloprovincialis* en ambos hemisferios (figura II). Qué especies de *Mytilus* se encuentran en Sudamérica está todavía en debate, y los resultados de los trabajos son contradictorios según el marcador molecular que se utilice. Astorga *et al.* (2015) encontraron dos grupos distintos de *M. galloprovincialis*, uno para cada hemisferio. Además, observaron que los diferentes *Mytilus* de Sudamérica son taxonómicamente independientes, es decir, genéticamente distintos a *M. edulis*, por lo que no debería considerarse una especie dentro de este complejo; así, proponen llamar al mejillón de Sudamérica, *Mytilus planulatus* y/o *M. platensis*. Por otro lado, Zbawicka *et al.* (2018) concluyen que *M. chilensis* y *M. platensis* son nativos del hemisferio sur, el primero ubicado en la costa chilena y Tierra del Fuego y el segundo en la costa argentina. Estos autores indican también que *M. galloprovincialis* fue introducido desde Europa al hemisferio sur por Puerto Madryn, probablemente por movimientos de semillas para emprendimientos de cultivo o como *biofouling* (acumulación de microorganismos en superficies artificiales) en las embarcaciones que llegan a ese puerto.

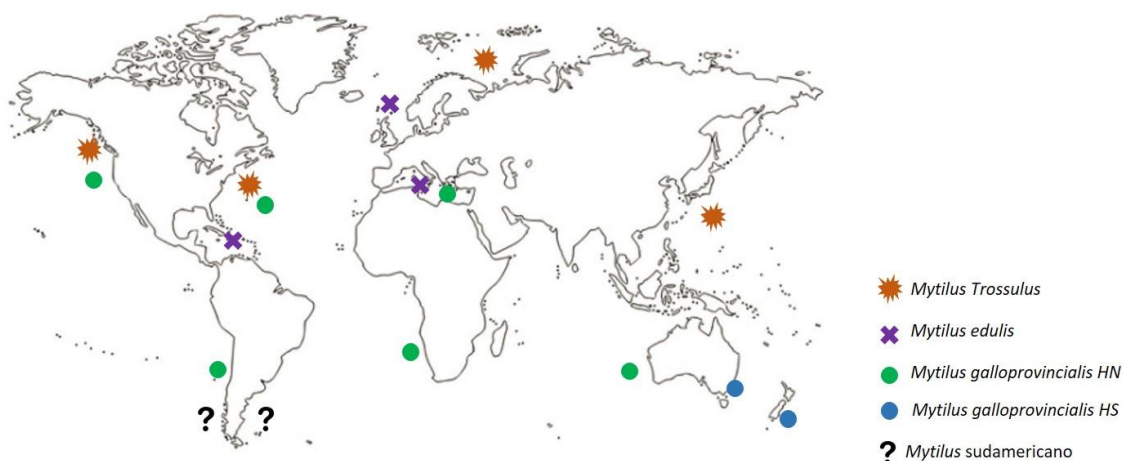


Figura II Mapa de la distribución geográfica de las distintas especies de *Mytilus*, modificado de Hilbish *et al.* (2000) y Astorga *et al.* (2015).

Con el objetivo de aclarar la situación taxonómica de los mejillones correspondientes a este trabajo, y de manera complementaria a los objetivos planteados en esta tesis doctoral, se ha analizado una submuestra mediante marcadores moleculares nucleares y mitocondriales por la Dra. G. Vanina Villanova (IBR-CONICET-UNR) y su grupo de trabajo. Mediante el marcador Me15/16 los resultados obtenidos hasta el momento sugieren la presencia de *Mytilus edulis* en 304 de los 308 individuos analizados. Sin embargo, también se observó la presencia de 4 individuos híbridos pertenecientes a *M. edulis*/*M. trossulus* en un stock de cultivo y *M. edulis*/*M. galloprovincialis* en un banco natural. La metodología molecular utilizada por la Dra. Villanova está basada en los trabajos de Santaclara *et al.* (2006) y Fernández-Tajes *et al.* (2011), donde se propone para la clasificación de las muestras la amplificación del marcador Me, el cual clasifica en *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*. Con estos métodos no fue posible distinguir a *M. platensis* o *M. edulis platensis*, por lo tanto el grupo de trabajo de la Dra. Villanova incorporará una nueva metodología para evaluar la hipótesis de Zbawicka *et al.* (2018). Por consiguiente, a lo largo del manuscrito de la tesis seguiré haciendo referencia a la especie como *Mytilus edulis*.

La dificultad en determinar el estatus taxonómico de los mejillones se debe al polimorfismo y a la capacidad que tienen estas especies de reproducirse mediante fertilización externa.

Con respecto a este último punto, cuando se encuentran en simpatria, dos o más especies que viven en áreas que se solapan, la hibridación es muy común entre *Mytilus* spp (Westfall y Gardner 2013). Por ejemplo, Zbawicka *et al.* (2018) encontraron híbridos de *M. platensis* y *M. galloprovincialis* en Puerto Madryn. En general los moluscos bivalvos, y en particular la familia Mytilidae, se caracterizan por presentar una alta plasticidad fenotípica en respuesta a variaciones de las condiciones ambientales locales así como a la presión de depredación, la desecación y el oleaje (Akester y Martel 2000; Beadman *et al.* 2003; Cubillo *et al.* 2012b; Funk y Reckendorfer 2008; Kirk *et al.* 2007; Márquez *et al.* 2017a; Márquez *et al.* 2010; Márquez y Van Der Molen 2011; Steffani y Branch 2003). Otro factor que potencialmente modifica el tamaño y la forma de las valvas es la densidad del banco o cultivo (Seed 1968), la cual puede ser manipulada en los cultivos para obtener un producto de alta calidad. Por lo tanto, la densidad también tiene consecuencias en la productividad de la cosecha (Cubillo *et al.* 2012b; Gosling 2003). Así, es relevante para la industria de la acuicultura del mejillón conocer cómo la densidad de cultivo afecta a la morfología y a la relación entre forma de valva / tejido (rendimiento). Asimismo, es importante tener conocimiento acerca de las distintas condiciones de cultivo, es decir, la densidad de las unidades de cultivo y su distribución espacial en el área de producción, ya que modifican las características ecológicas y oceanográficas de las áreas en las cuales se desarrolla el engorde de los individuos (Cubillo *et al.* 2012a; Cubillo *et al.* 2012b; Lauzon-Guay *et al.* 2005). En el área donde se ubican los cultivos se producen cambios en los fondos: se generan desechos sólidos, conocidos como biodepósitos, los cuales pueden modificar el tamaño de partícula, contenido de materia orgánica, ciclo del nitrógeno y potencial redox del sedimento bajo de los cultivos (Dahlbäck y Gunnarsson 1981; Grant *et al.* 1995; Rosenthal 1995). En adición, los sistemas de cultivo modifican los patrones de flujo de agua y sedimentación (Christensen *et al.* 2003; Dahlbäck y Gunnarsson 1981; Kaspar *et al.* 1985; Rosenthal 1995; Tenore 1982) y la profundidad a la que se encuentra la capa anóxica en los sedimentos, debido a la disminución de la penetración de oxígeno en el sedimento (La Rosa *et al.* 2001; Mirto *et al.* 2000).

Morfometría Geométrica

La comprensión de la diversidad biológica y la taxonomía de los organismos estuvieron basadas históricamente sobre descripciones morfológicas (Adams *et al.* 2004). Con el fin de establecer la correspondencia entre la forma y la función, y para cuantificar la descripción de los rasgos utilizados en la identificación de las especies, la variación en forma fue registrada históricamente mediante estudios morfológicos cualitativos. Sin embargo, la descripción cualitativa de la forma puede ser imprecisa o inexacta y es necesaria cierta precisión a la hora de describir y comparar, es así como se llega a utilizar la medida cuantitativa en la descripción de la forma (Zelditch *et al.* 2004). La morfometría es simplemente un modo cuantitativo de abordar las comparaciones de formas. Los estudios cualitativos producen imágenes o descripciones detalladas (en las que las analogías ocupan un lugar destacado), mientras que los estudios morfométricos clásicos generalmente producen tablas con listas de números interminables (Zelditch *et al.* 2004). El hecho de que la forma, ampliamente entendida, se haya cuantificado con variables matemáticas, junto con la acumulación de grandes cantidades de datos, fomentó el desarrollo de métodos estadísticos como el coeficiente de correlación (Pearson 1920), el análisis de la varianza (Fisher 1935) y el análisis de los componentes principales (Hotelling 1933; Pearson 1901). La descripción cuantitativa de la morfología combinada con análisis estadísticos multivariados se utiliza en la descripción de patrones de variación dentro y entre grupos y su covariación con otras variables (Bookstein 1991; Dryden y Mardia 1998). A comienzos del siglo XX, en su trabajo *On Growth and Form* (1917), D'Arcy Thompson generó la base para el desarrollo de una nueva manera de entender la variación de forma, utilizando grillas superpuestas. Este nuevo enfoque tuvo que esperar hasta el desarrollo de la teoría estadística de la forma realizado por Kendall (1984) para dar inicio a lo que se conoce en la actualidad como morfometría geométrica (MG). El desarrollo de sistemas de análisis de imágenes en conjunto con el desarrollo de *software* o programas computacionales gratuitos han facilitado el progreso del estudio detallado de la forma en diversas estructuras (Adams *et al.* 2013). Así, la MG puede ser considerada como la unión entre la geometría, los

métodos estadísticos multivariantes y la informática para el análisis de imágenes en diferentes disciplinas (Bookstein 1982). El uso de puntos espaciales (cartesianos) para el análisis del cambio en la forma ha constituido una revolución en el campo de la morfología (Adams *et al.* 2004). Una de las ventajas de la MG es la posibilidad de separar a la forma de un objeto (*form*) en la forma propiamente dicha (*shape*) y el tamaño (*size*).

En el caso de los bivalvos, el tener valvas duras los convierte en excelentes candidatos para el análisis morfométrico (Rufino *et al.* 2013). Existen varios ejemplos de estudios donde se utiliza la forma de la valva para diferenciar entre especies que tienen forma similar (Costa *et al.* 2008; Ferson *et al.* 1985; Innes y Bates 1999; Rufino *et al.* 2006; Van der Molen *et al.* 2013) o para analizar la variación intraespecífica asociada a rangos geográficos (Krapivka *et al.* 2007; Márquez *et al.* 2017a; Márquez y Van Der Molen 2011; Palmer *et al.* 2004). Un componente aplicado del uso de la morfometría geométrica en moluscos puede encontrarse en la identificación de *stocks* fenotípicos (Cadrin y Friedland 1999; Márquez *et al.* 2010; Márquez *et al.* 2017b; Rufino *et al.* 2013), definidos como aquellas poblaciones o grupos en los cuales todos los miembros presentan características (crecimiento, mortalidad y tasas de reproducción) similares (Waldman 2005). Este tipo de información es necesaria para la gestión correcta de las pesquerías, lograr una producción sostenible, evitar fallas en el reclutamiento, reconstruir *stocks* que han sido sobreexplotados y para la conservación de especies amenazadas y/o en peligro de extinción (Cadrin 2000; Yusseppone *et al.* 2018). Por lo tanto, la caracterización de variaciones de la forma de los mejillones de distintas zonas de producción, así como la diferenciación entre *stocks* cultivados y naturales podría ser utilizada como medida de control pesquero, ya que dando a conocer su origen se avanza en el conocimiento de la trazabilidad del producto comercial. La morfometría geométrica ha sido utilizada con éxito como herramienta para determinar variaciones sutiles en la forma de las valvas de bivalvos permitiendo determinar su procedencia (Krapivka *et al.* 2007; Márquez *et al.* 2010; Márquez *et al.* 2017b; Palmer *et al.* 2004). Consecuentemente se espera que esta tesis aporte, desde la perspectiva de la morfometría geométrica, las

bases biológicas para desarrollar potenciales medidas de manejo y control en el cultivo de mejillones, actividad de inminente crecimiento en la provincia de Chubut.

Trazabilidad y Denominación de Origen (DOI)

Según el comité de seguridad alimentaria de la Asociación Española de Codificación Comercial (AECOC), la trazabilidad debe entenderse como *“el conjunto de aquellos procedimientos preestablecidos y autosuficientes que permiten conocer el origen histórico, la ubicación y la trayectoria de un producto o lote de productos a lo largo de la cadena de suministros en un momento dado, a través de unas herramientas determinadas”*. A su vez, un estudio realizado por Ogden (2008) identificó tres niveles en la trazabilidad de los productos pesqueros, a saber: identificación de la especie, determinación del origen geográfico y seguimiento y rastreo en la cadena de suministro. Existen varias formas de mercantilización de productos de mar, en particular, los bivalvos pueden ser comercializados vivos o muertos (con o sin valvas). En este contexto, el fraude comercial es factible de realizarse y tanto los consumidores como la industria pesquera están interesados en que se lleve a cabo el correcto etiquetado de los productos del mar y así lograr transparencia en el comercio internacional (Espíñeira *et al.* 2009). Todos los productos procedentes de la pesca y de la acuicultura deben estar correctamente etiquetados con el nombre comercial de la especie, el método de producción y la zona de captura antes de entrar en el circuito comercial. Así, el desarrollo de métodos analíticos para la autenticación de las especies es necesario para detectar y evitar la equivocación entre especies u orígenes del producto y, de esta manera, reforzar las regulaciones de los productos y aumentar su valor agregado (Fernández-Tajes *et al.* 2010).

Desde el Ministerio de Producción y Trabajo de la República Argentina se busca vincular la calidad, reputación y características diferenciales de un producto con su región o zona productora, ya sea mediante la Indicación Geográfica (IG) o la Denominación de Origen (DO) (www.alimentosargentinos.gob.ar 2019). Según la Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas, la utilización de IG o DO sobre un producto sirve para: asegurar la procedencia

geográfica de los productos, evitando falsificaciones y engaños; evidencia la calidad especial del producto como consecuencia del lugar del cual proviene; asegura el cumplimiento de un protocolo adecuado; y protege procedimientos de elaboración de productos propios de la zona. Para lograr que el producto obtenga alguna de estas certificaciones (IG o DO) es necesario un conocimiento detallado de las características físicas y químicas de la especie a comercializar, como también del ambiente donde se desarrolla, en este punto es donde la ciencia puede aportar conocimiento tanto a la industria pesquera como a las entidades de manejo. Los datos o las estadísticas registrados sobre el comercio internacional no distinguen entre el origen cultivado o salvaje de los productos, a pesar del rápido crecimiento del sector acuícola y el porcentaje cada vez mayor de especies cultivadas y productos derivados de ellas (FAO 2018). Actualmente, la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) cuentan con una comisión que se denomina “*Codex Alimentarius*”, la cual ofrece las directrices para la producción, elaboración, etiquetado y comercialización de alimentos producidos orgánicamente (FAO/OMS 2005). Respecto al mejillón, muchas veces los individuos de bancos naturales presentan menor calidad del producto, por lo que también se hace necesaria una herramienta que permita la diferenciación y potencial fiscalización de productos provenientes de bancos naturales y de cultivos. El etiquetado de los alimentos es el instrumento de comunicación primordial entre el productor y el vendedor de alimentos, por una parte, y el comprador y el consumidor, por otra (FAO/OMS 2005), y permite conocer, entre otros elementos, los componentes, el origen, las fechas, las transformaciones y las condiciones de procesamiento que el producto ha experimentado a lo largo de todo el proceso (Larraín *et al.* 2014).

Objetivos

Objetivo general

Se propone como objetivo general de esta tesis comparar la variación morfológica del mejillón (*Mytilus edulis*) entre y dentro de las zonas productivas de la provincia del Chubut, y con el mejillón importado de Chile.

Objetivos particulares

- 1- Analizar la variación de la forma de la valva del mejillón de bancos naturales y cultivados de cada una de las zonas productivas de la provincia de Chubut.
- 2- Comparar la variación morfológica de las valvas del mejillón dentro (cultivados vs. naturales) y entre áreas productivas.
- 3- Establecer el grado de relación entre la forma de las valvas, las densidades y el rendimiento (relación valva/tejido) para cada zona de producción de la provincia del Chubut.
- 4- Comparar la variación de la forma de la valva de los mejillones del Chubut con individuos provenientes de los principales importadores de mejillones chilenos.

Metodología General

Sitios de muestreo

La provincia de Chubut está ubicada al centro-sur de la región patagónica (entre los paralelos 42 y 46 de latitud sur) y cuenta con una gran variedad de climas y paisajes. En su litoral marítimo los accidentes costeros más destacados son la Península Valdés y el Golfo San Jorge. En esta provincia se realiza la extracción de mejillones con fines comerciales, tanto de los bancos naturales del intermareal como de los bancos naturales del submareal, mediante buceo. Desde hace tiempo existe interés para desarrollar proyectos de acuicultura en general y de maricultura en particular. El mejillón, proveniente de la pesca o del cultivo, se comercializa sólo en el mercado interno, a nivel local, regional y nacional. Se lo vende principalmente vivo o también denominado fresco y en menor escala parte de la producción se procesa en media valva congelada y escabeche (www.argentina.gob.ar/agroindustria 2018). Dado que uno de los objetivos de esta tesis es comparar la variación morfológica entre los mejillones que provienen de bancos naturales y de cultivos de la provincia de Chubut, se seleccionaron localidades donde hubiera proyectos de cultivo de mejillón en desarrollo. En el año 2012, desde la Dirección de Acuicultura de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura se llevó a cabo un informe denominado *“Situación actual de las Zonas productivas de moluscos bivalvos de la Provincia de Chubut”*, en donde se detallan los distintos actores que trabajan en relación a la extracción y cultivo artesanal de moluscos bivalvos. De este informe se desprende que: la Asociación de Pescadores Artesanales de Puerto Madryn en el año 2011 extrajo por pesquería 630 tn de vieira y 45 tn entre mejillón, almeja y cholga; en la Granja Marina San Julián en Bahía Camarones se producen por acuicultura 20 tn anuales, con perspectivas de aumentar a 50 tn; el Colegio n° 721 “Caleta Horno”, también en Bahía Camarones, produce por acuicultura 3 tn de mejillón adulto y 2 tn de semilla; los maricultores de Playa Belvedere tuvieron en 2011 una producción de 4 tn de mejillón. Por lo tanto, las muestras para el desarrollo de la presente tesis, se colectaron en las localidades de Riacho San José (42°24' 41" S, 64° 37'04" W) en marzo del 2015, en Bahía Camarones (44° 54'05.9" S, 065°35'28.3" W; Caleta Carolina) en Abril del 2015 y en Comodoro Rivadavia (45°57'42.1" S, 67°33'17.0"

W; Playa Belvedere) en Mayo del 2015 (figuras III). A partir de aquí y a lo largo de todo el manuscrito haré referencia a las localidades como: Riacho, Camarones y Comodoro.

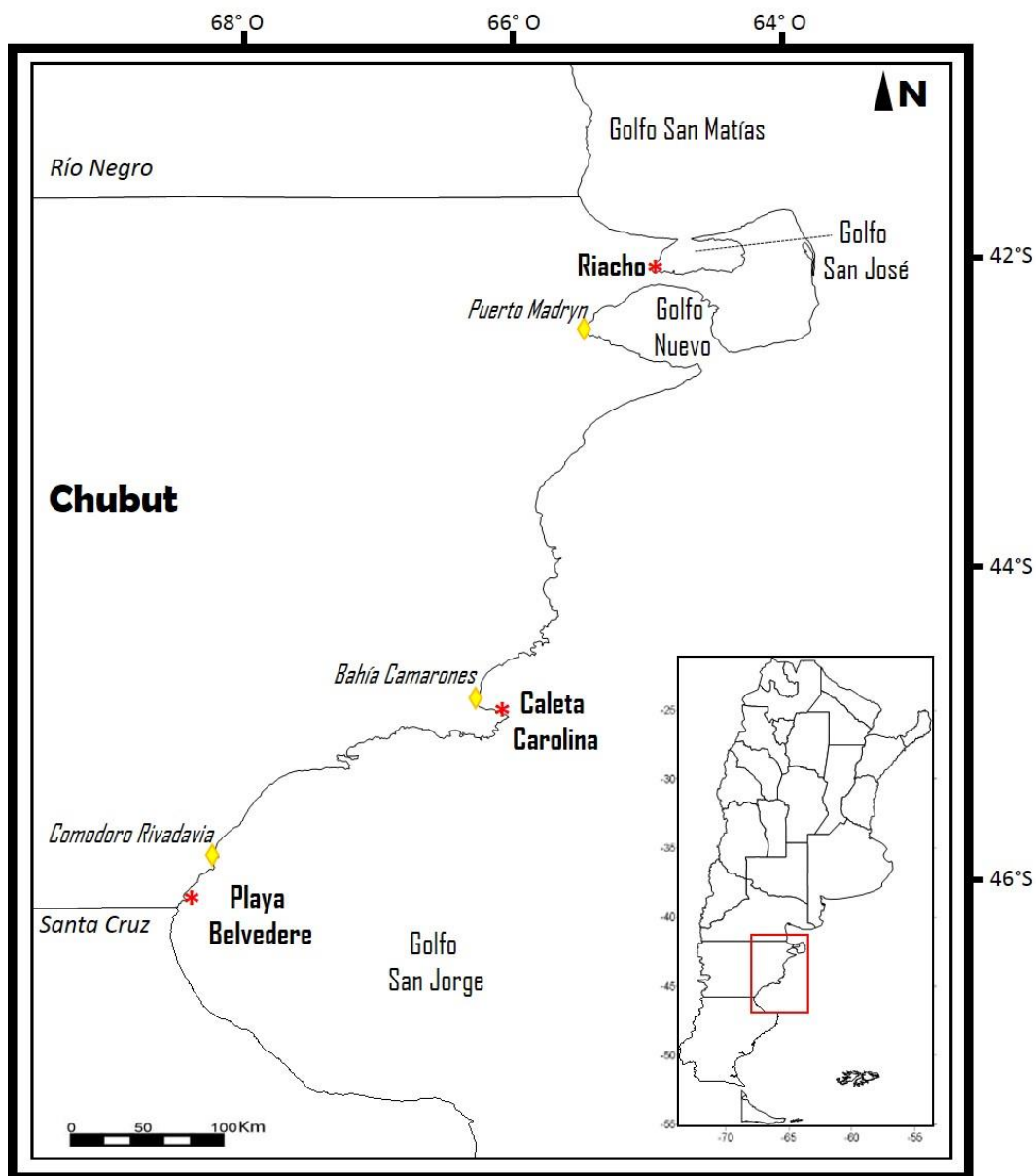


Figura III Mapa de las localidades de muestreo. Con estrellas rojas se muestran las localidades de muestreo y con rombos amarillos las ciudades más cercanas.

Tanto el total de individuos muestreados como los digitalizados, por localidad y hábitat, se muestra en la tabla I.

Tabla I Número total de mejillones muestreados y digitalizados por localidad y hábitat. Referencia: RiCC (Riacho Cultivo), RiBN (Riacho Banco Natural), CaCS (Camarones Cultivo Stephane), CaCE (Camarones Cultivo Escuela), CaBN (Camarones Banco Natural), CoCM (Comodoro Cultivo ACC), CoCE (Comodoro Cultivo Escuela) y CoBN (Comodoro Banco Natural).

	Muestreados	Digitalizados
Riacho	732	181
BN	658	107
CC	74	74
Camarones	954	296
BN	453	97
CE	180	106
CS	321	93
Comodoro	752	306
BN	362	101
CE	289	104
CM	101	101
Total	2438	783

En Riacho se realizó el muestreo con la ayuda de los pescadores artesanales que residen allí, con quienes nos contactamos a través de Gloria Mariño, presidenta de la asociación de pescadores artesanales. Los pescadores aportaron toda la logística para llegar al banco natural “Los Palos” (RiBN) y hasta donde se encuentran las camas de cultivo (RiCC). En Camarones se colectaron individuos del banco natural de Caleta Carolina (CaBN) y, con la ayuda de Stephane Sorroche (maricultor), de dos cultivos: el cultivo privado de Granja Marina San Julián (CaCS) del cual es propietario y el cultivo de la Escuela n° 721 (CaCE). En Comodoro se muestreó en el banco natural de Playa Belvedere (CoBN) y en los cultivos de la Agencia Comodoro Conocimiento (cultivo ACC, CoCM, contacto: Hernán Marraco, coordinador del programa) y de la escuela n° 704 (CoCE, contacto: Jorge Álvarez, vicedirector). La ubicación geográfica de cada sitio de muestreo se muestra en la figura IV.



Figura IV Detalle de los sitios de muestreo. a) Riacho: con círculo amarillo se marca el cultivo (RiCC) y con una cruz roja el banco natural (RiBN). b) Camarones: el círculo amarillo señala el cultivo de Stephane Sorroche (CaCS), la línea amarilla el cultivo de la escuela n° 721 (CaCE) y la cruz roja el banco natural (CaBN). c) Comodoro: el cultivo de Agencia Comodoro Conocimiento (CoCM) se señala con un círculo amarillo, el de la escuela n° 704 (CoCE) con una línea amarilla y con la cruz roja el banco natural (CoBN).

Muestreos

Bancos naturales

Los bancos naturales muestreados fueron todos intermareales, por lo tanto, cuando se mencione a los bancos naturales se hará referencia a bancos intermareales. En las tres localidades se utilizó el banco natural con mayor densidad aparente, en el cual se lanzaron al azar 10 cuadrantes de 25x25 cm y se colectaron todos los mejillones dentro de los mismos. Cada muestra fue guardada en una bolsa individual debidamente etiquetada. El mismo protocolo de muestreo se realizó para todos los bancos intermareales (figura V) y

en el cultivo de Riacho, dado que este se desarrolla sobre camas planas suspendidas sobre el intermareal.



Figura V Detalle un cuadrante para cada lugar de muestreo. Referencias: RiBN: Riacho Banco Natural CaBN: Camarones Banco Natural, CoBN: Comodoro Banco Natural.

Cultivos

El sistema de cultivo utilizado en Camarones y en Comodoro, por las particularidades de sus costas, es el conocido como *longline*, el cual consiste en una línea principal o “madre” de la que cuelgan las líneas secundarias de crecimiento o colectores, que quedan suspendidas en la columna de agua. Dentro de este sistema de cultivo pueden variar los tipos de material que se utilizan, como las cuerdas (nylon o red) y la profundidad a la cual se ubica la línea madre; por ejemplo, el cultivo de la escuela de Comodoro (CoCE) tiene la cuerda madre en la superficie, mientras que en el cultivo de Stephane Sorroche en Camarones (CaCS) se encuentra a una profundidad de 7 metros y utiliza boyas para mantenerla a flote (figura VI). En Riacho, aprovechando la buena captación de semillas, se utilizan camas sobre el intermareal como método de cultivo.

En los muestreos de cultivo en *longline* (Camarones y Comodoro), se eligieron 6 cuerdas al azar, una de cada línea principal y se colectaron los mejillones que ocupaban los primeros 25 cm de cuerda. Cada muestra se guardó en una bolsa individual, debidamente etiquetada (figura VII).

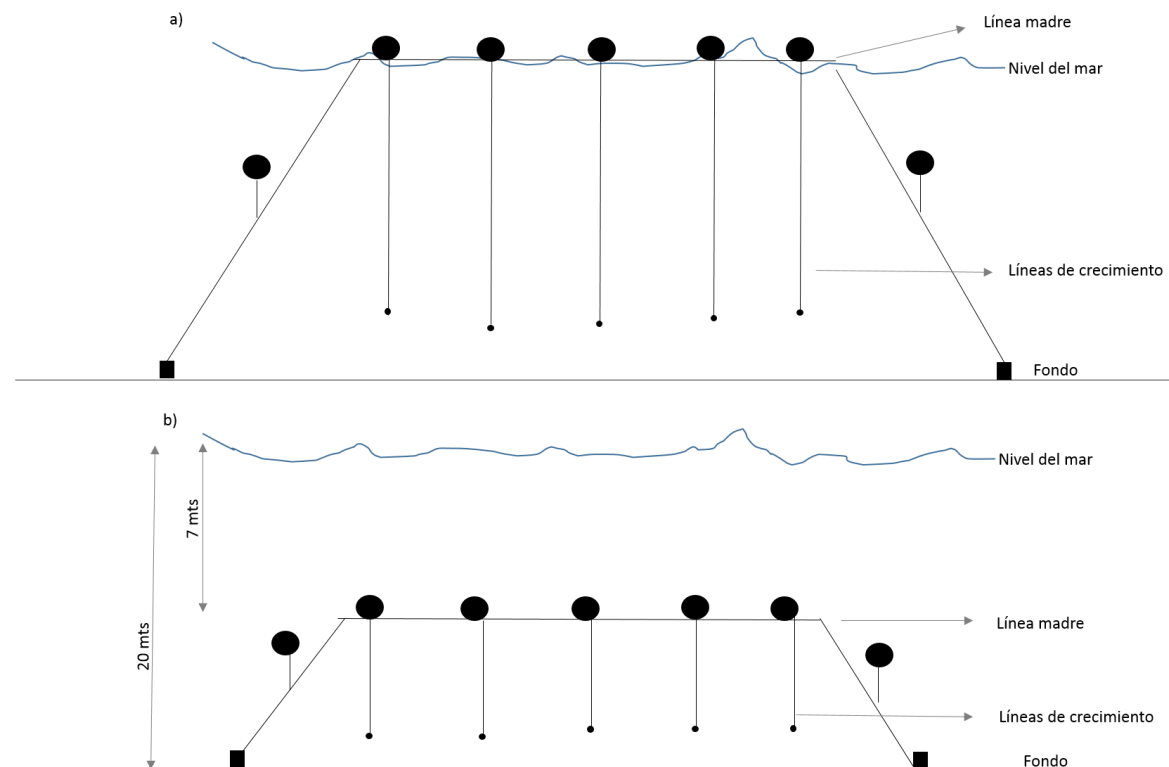


Figura VI Variantes del sistema de cultivo *longline* utilizados en la provincia de Chubut. a) Línea madre en la superficie. b) Línea madre fondeada a 7 metros de profundidad



Figura VII Sistemas de cultivo muestreados. Referencias: RiCC: Riacho Cultivo Cama, CaCS: Camarones Cultivo S. Sorroche, CoCE: Comodoro Cultivo Escuela (Foto de Renato Frias).

Laboratorio

Los ejemplares fueron pesados enteros en una balanza (precisión de 0,01 g) y con calibre digital (0,01 mm) se registraron longitud total, ancho y altura de la valva (figura VIII). Luego, utilizando un bisturí para cortar los músculos aductores y el ligamento, se abrieron los mejillones y se realizó una inspección ocular sobre las gónadas para determinar el sexo, según la coloración de las gónadas (Zaixso 2015). Luego se separó la pulpa de las valvas de modo de registrar sus pesos por separado para los cálculos de rendimiento (capítulo 3).

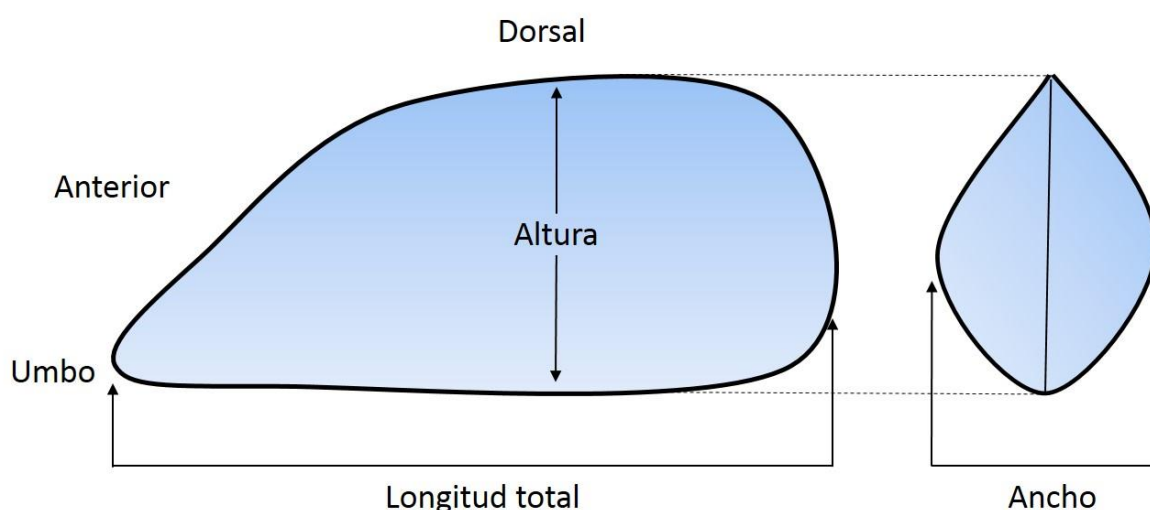


Figura VIII Esquema de las medidas registradas con calibre digital.

Las valvas se dejaron secar sobre papel tisú y luego fueron etiquetadas y guardadas para su posterior digitalización.

Obtención de las imágenes

Utilizando un escáner 2D Epson Perfection V370 Photo, se escanearon las dos valvas (derecha e izquierda) de 30 individuos de cada cuadrante o línea de cultivo junto a una escala (figura IX). Luego se generó una carpeta de archivos donde se guardaron las imágenes de cada uno de los individuos utilizando como nombre de cada archivo un código de identificación. Se realizó un compilado de imágenes, para luego asignar al azar las posiciones de los individuos y, de esta manera, las imágenes luego fueron digitalizadas al

azar entre todas las muestras. Estos primeros pasos se realizaron en el *software* TpsUtil versión 1.74 (Rohlf 2017a).

Digitalización y obtención de variables de forma

Se digitalizaron y escalaron ambas valvas de cada individuo en el *software* TpsDig2 versión 2.30 (Rohlf 2017b). Según la pregunta a responder, para los análisis estadísticos se utilizaron las variables de forma obtenidas de ambas valvas (capítulo 1, asimetrías) o solo de la derecha (capítulo 2).



Figura IX Salida gráfica de un escaneo, donde se observan la valva izquierda y derecha de cada individuo.

Los *landmarks* son puntos anatómicamente discretos, reconocibles en todos los individuos en estudio (Zelditch *et al.* 2004) y localizados en estructuras con homología biológica y/o matemática. En el caso de estructuras curvas, en las cuales no exista la presencia de *landmarks* o en el caso de que los *landmarks* utilizados no logren cubrir la totalidad de la forma a estudiar, se utilizan *semilandmarks*; que son puntos que se distribuyen

uniformemente sobre la superficie que se quiere capturar y que son luego homologados matemáticamente (Bookstein 1991). Entonces, los *landmarks* son coordenadas cartesianas, en el plano (x,y) o en el espacio (x,y,z) con respecto a un sistema de ejes. En esta tesis se utilizó una configuración bidimensional de 8 *landmarks* y 22 *semilandmarks*, y se registraron a las coordenadas cartesianas (x,y) como las variables de forma originales de los individuos (figura X), utilizando el *software* TPSDig2.

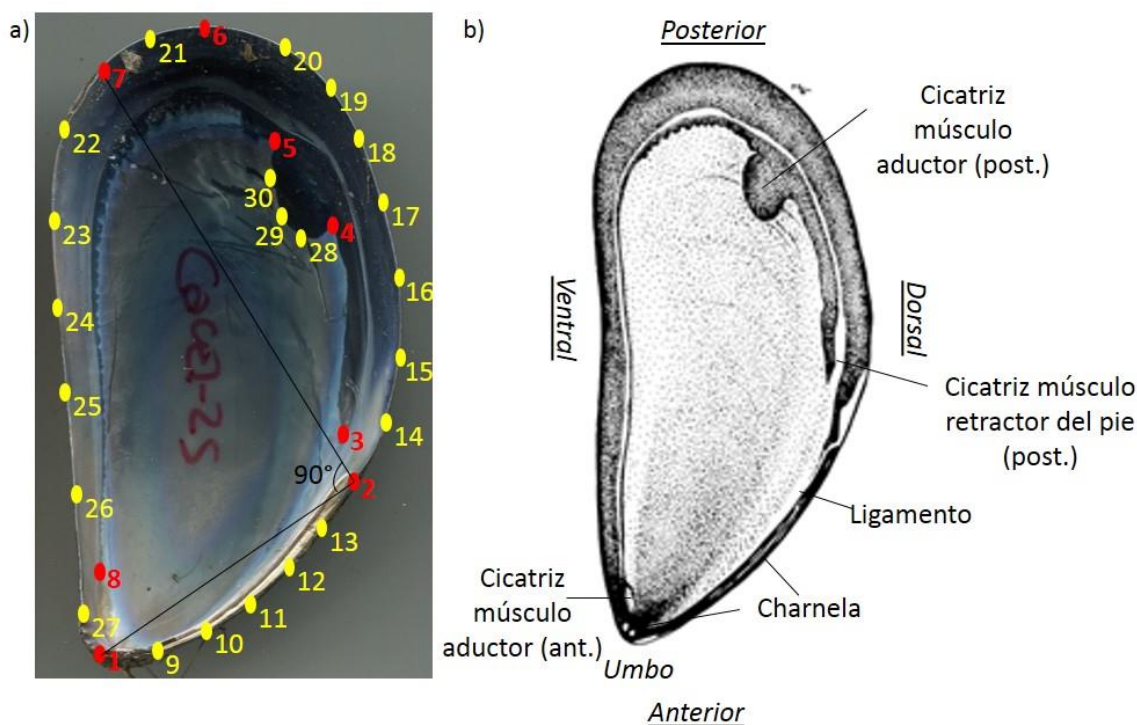


Figura X a) Configuración de *landmarks* (puntos rojos) y *semilandmarks* (puntos amarillos) en la valva derecha. Definición de los *landmarks*: (1) Umbo, (2) fin del ligamento en sentido dorsal, (3) inicio dorsal de la marca del músculo retractor del pie, (4) Marca dorsal del músculo aductor posterior, (5) Marca más ventral del músculo aductor posterior, (6) Máxima curvatura sobre el contorno posterior, (7) Proyección a 90 grados entre el *landmark* 1 y 2, (8) Marca del músculo aductor anterior. b) Características internas de la valva del mejillón utilizadas para la colocación de los *landmarks*.

El análisis directo de estas coordenadas originales como variables de forma (*shape*) sería inapropiado ya que la configuración de *landmarks* también contiene información de tamaño (*size*), orientación y posición (Adams *et al.* 2004). Por lo tanto, *shape* hace referencia a toda la información geométrica que permanece una vez eliminados del objeto los efectos de escala, rotación y posición antes mencionados (Bookstein 1991; Dryden y

Mardia 1998). Para poder realizar los análisis estadísticos pertinentes es necesario eliminar esta información, y esto se logra mediante el Análisis Generalizado de Procrustes (*GPA*, por sus siglas en inglés) (Rohlf y Slice 1990). Este análisis, también conocido como superposición de Procrustes consiste en trasladar las configuraciones de *landmarks* a un origen de coordenadas común, luego estas son escaladas a un mismo tamaño para eliminar su efecto y luego se rotan para minimizar la suma de cuadrados de las distancias entre sí, es decir, minimiza las desviaciones entre cada uno de los *landmarks* (Klingenberg y Marugán-Lobón 2013; Rohlf y Slice 1990). De esta manera mediante el *GPA* se eliminó toda la información no relacionada con la forma (*shape*), para este análisis se utilizó el *software* TPS Relw v.1.64 (Rohlf 2016). Otro paso indispensable cuando se trabaja con *semilandmarks* es deslizar los mismos a lo largo del contorno para minimizar la energía de curvatura (*bending energy*) hasta que coincidan con la configuración de referencia (Bookstein 1991), procedimiento que se realizó con el programa TPS Relw (Rohlf 2016). Esta configuración de referencia es llamada también forma consenso (es un individuo teórico, $n+1$ de la muestra), que no es más que el promedio de las formas bajo estudio. Entonces, las coordenadas de Procrustes de los individuos alineados fueron utilizadas como variables de forma para realizar los análisis estadísticos multivariantes, que se realizaron con el *software* MorphoJ v1.06d (Klingenberg 2011). La variación en la forma es representada así por las diferencias entre las distancias entre *landmarks* homólogos de cada individuo y la forma consenso (Corti y Crosetti 1996). Al realizarse el ajuste de Procrustes, se obtiene un valor de tamaño (*centroid size*) para cada individuo y es utilizado para estudiar las variaciones en tamaño independientemente de las de forma. Aunque la definición de tamaño (*size*) puede variar según la pregunta biológica, en MG se utiliza al *centroid size* como estimador insesgado del tamaño, que está definido como la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado desde un conjunto de *landmarks* al centroide que ellos definen (Zelditch *et al.* 2004).

**Capítulo 1: Descripción de la forma de
la valva del mejillón (*M. edulis*) de
bancos naturales y cultivados de cada
una de las zonas productivas de la
provincia de Chubut**

1.1 Introducción

Desde hace siglos ha existido interés por el estudio de las formas biológicas, utilizando diferentes aproximaciones metodológicas; desde la simple observación y descripción de los rasgos de los organismos hasta complejos análisis moleculares. Con el devenir de los años se ha producido información biológica, generando los marcos teóricos actuales respecto a la taxonomía, los métodos de clasificación y las diferentes hipótesis de relación estructura - función (Adams *et al.* 2013). Una gran variedad de procesos biológicos (i.e enfermedades, desarrollo ontogenético, adaptación a factores geográficos locales, diversificación evolutiva a largo plazo) producen variaciones de forma entre los individuos o entre las partes de un mismo individuo; esta variabilidad puede indicar distintas funcionalidades o diferentes respuestas a las mismas presiones selectivas, así como divergencias en el crecimiento y morfogénesis (Zelditch *et al.* 2004). Por lo tanto, el estudio de la variación en la forma es un enfoque útil para comprender las diversas causas de la variabilidad.

Durante los primeros años del siglo XX, la biología comenzó la transición de un campo descriptivo a una ciencia cuantitativa (Adams *et al.* 2004), convirtiendo al estudio de la forma en una rigurosa disciplina cuantitativa (Bookstein 1998; Thompson 1915). Tradicionalmente, los estudios de la forma se desarrollaron mediante la aplicación de análisis estadísticos univariados o multivariados a un conjunto de rasgos definidos como distancias lineales (i.e longitud, ancho y altura), conteos, relaciones y ángulos (Adams *et al.* 2004; Zelditch *et al.* 2004), lo que se conoce como morfometría clásica o multivariante. El tipo de dato utilizado en la morfometría clásica presenta varios inconvenientes (Adams *et al.* 2004), entre los principales se encuentran la no independencia entre los componentes de forma y tamaño y que los resultados se expresan de tal manera que la variaciones son difíciles de interpretar (Rohlf y Marcus 1993). Una vez desarrollada de modo riguroso la teoría estadística de la forma por Kendall (1984) y otros estadísticos, se logró capturar la geometría de las estructuras morfológicas manteniéndola a lo largo de los análisis estadísticos (Adams *et al.* 2004). De este modo, se generó una revolución en el estudio de las variaciones biológicas y a este nuevo enfoque se lo denominó "morfometría geométrica"

(MG) (Rohlf y Marcus 1993). A medida que el paradigma evolutivo se fue consolidando, se incluyeron estudios cuantitativos en la discusión de la variación natural y las relaciones filogenéticas entre especies (Richtsmeier *et al.* 2002). La MG propone estudiar los cambios en el tamaño y la forma a partir del desplazamiento en el plano (2D) o en el espacio (3D) de un conjunto de puntos morfométricos o “*landmarks*” (Zelditch *et al.* 2004). Estos puntos corresponden a un rasgo distintivo en todos los objetos de estudio (poseen homología) y están basados en coordenadas cartesianas. Las estructuras anatómicas donde se fijan los puntos son homólogas porque son discretas (distintas de otras estructuras) y reconocibles en todos los especímenes en estudio, pero la homología no es necesariamente biológica, también puede ser estructural o matemática (Zelditch *et al.* 2004). La MG no presenta restricciones en las direcciones de variación y localización de los cambios de forma y, combinada con estadística multivariada, ofrece una herramienta sumamente poderosa para estudiar los cambios en la forma de diversos objetos.

Respecto de los cambios en la forma, por razones puramente biomecánicas, se espera que los organismos cambien su forma a medida que crecen, a esta asociación entre forma y tamaño se la denomina alometría (Zelditch *et al.* 2004). En el trabajo realizado por Klingenberg (2016) se hace referencia a dos escuelas principales de pensamiento acerca de métodos alternativos para estudiar la alometría. Una es la escuela Huxley-Jolicoeur, la cual define a la alometría como la covariación entre los rasgos como consecuencia de la variación en el tamaño, sin distinguir entre forma y tamaño, ya que bajo esta línea de pensamiento el tamaño es intrínseco en cada variable morfológica. La otra es la escuela Gould-Mosimann, la cual define a la alometría como la covariación de la forma con el tamaño. Esta noción de alometría será la utilizada en el desarrollo de este escrito. Si bien las técnicas de MG independizan el factor tamaño durante el análisis de la forma, la forma puede contener efectos alométricos y tienen que ser corregidos para trabajar con variables de forma libres de alometría. La alometría se puede evaluar a través de la regresión multivariada entre las variables de forma (variable dependiente) y la de tamaño (variable independiente)

(Monteiro 1999). En caso de presentar alometría, esta se puede corregir utilizando los residuales de dicha regresión como nuevas variables de forma libres de alometría.

Por otro lado, la variación morfológica de los organismos está integrada; es decir, los tamaños y las formas de las partes varían de manera coordinada para que cada organismo forme un todo funcional. Esta integración no es uniforme en todos los organismos, pero generalmente se organiza de forma modular, con complejos de partes o módulos estrechamente integrados que son relativamente independientes el uno del otro (Klingenberg 2008; Klingenberg y Marugán-Lobón 2013; Schlosser y Wagner 2004). Esta tensión entre la coordinación y la independencia relativa entre los módulos se ha capturado en los conceptos de integración y modularidad (Klingenberg 2008), conceptos íntimamente conectados. Olson y Miller (1958) propusieron que los rasgos que se desarrollan o funcionan en conjunto tienden a estar fenotípicamente correlacionados y, por lo tanto, evolucionarán como un todo funcional. La integración es la tendencia de diferentes rasgos para variar conjuntamente, de forma coordinada, a lo largo de una estructura morfológica o incluso en un organismo completo. La potencia de la integración está relacionada con la distribución de la variación sobre las dimensiones del espacio del fenotipo: la integración es más fuerte si todas las variaciones se concentran en una sola dimensión y está ausente si la variación se distribuye de manera uniforme en todas las dimensiones disponibles (Klingenberg 2008). La modularidad existe si la integración es fuerte dentro de los módulos (ciertas partes o regiones de una estructura) pero es relativamente débil entre ellos (Klingenberg 2014). Por lo tanto, los módulos son regiones que están integradas internamente pero que son relativamente independientes entre sí. Uno de los principales objetivos de los estudios morfométricos de modularidad es delimitar módulos y evaluar hipótesis sobre sus límites (Klingenberg 2009) (figura 1.1).

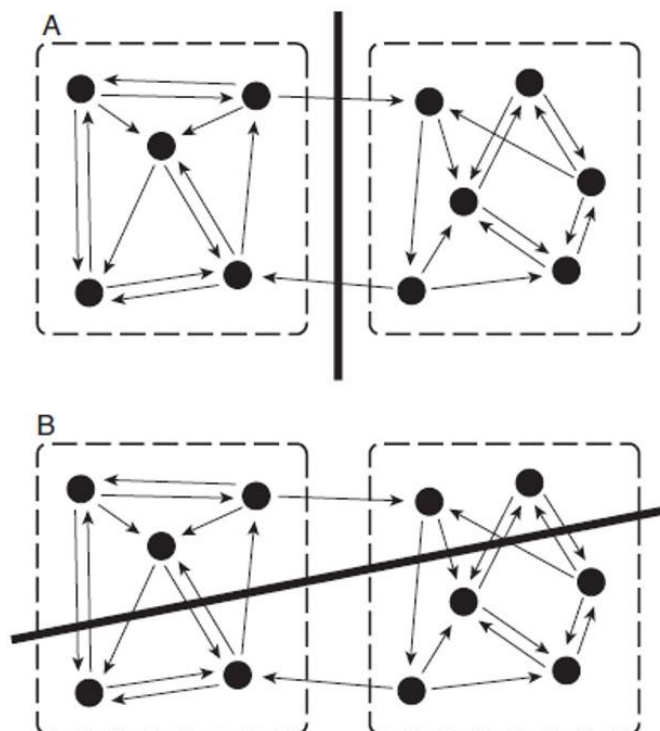


Figura. 1.1 Comparación de diferentes particiones de una estructura. Cada diagrama muestra dos módulos (cuadrados de líneas discontinuas) cuyas partes están integradas internamente por muchas interacciones (flechas), pero que son relativamente independientes entre sí porque hay pocas interacciones entre los módulos. Las líneas en negra indican dos formas de dividir la estructura general en dos subconjuntos. (A) La subdivisión coincide con el límite entre los módulos. (B) La subdivisión no coincide con el límite modular y, por lo tanto, abarca ambos módulos. Tomado de Klingenberg 2009.

Dentro de una misma especie existen múltiples niveles de variación biológica que pueden surgir de diferentes fuentes: variación genética, plasticidad fenotípica resultante de la heterogeneidad ambiental y asimetría fluctuante debido a la variación aleatoria del desarrollo; y, entre distintas especies, a nivel de cambio evolutivo (Klingenberg 2014). Estos niveles fueron clasificados tanto para alometría como para integración y modularidad en tres niveles (figura 1.2) (Klingenberg 2014; Klingenberg 2016):

- 1- *Ontogenético*: En el caso de la alometría, hace referencia al aumento de tamaño debido al crecimiento, en individuos de una sola especie. Con respecto a la integración/modularidad, se refiere a la covariación de rasgos a través de etapas ontogenéticas en una sola población. Se puede esperar que esta integración sea

fuerte, porque la mayoría de las partes de los organismos cambian de manera coordinada durante la ontogenia (Klingenberg 2014).

- 2- *Evolutivo*: Para la alometría este nivel hace referencia a las diferencias de tamaño entre las especies. La covariación entre rasgos morfológicos por cambios evolutivos se origina a partir de una gama de procesos que incluyen la deriva, la mutación, la selección y el flujo génico (Armbruster y Schwaegerle 1996; Klingenberg 2014)
- 3- *Estático*: La alometría estática se debe a la variación del tamaño dentro de una población y en una sola etapa de crecimiento. Este nivel es el nivel de variación frecuentemente utilizado en estudios empíricos de integración y modularidad, donde se estudia la variación entre individuos en una muestra homogénea, donde todos los especímenes son de la misma especie y etapa ontogenética (Klingenberg 2014). Este nivel de variación es, por lo tanto, el nivel donde se realizaron los análisis de esta tesis doctoral.

Por lo tanto, es conveniente que los sustantivos módulo y modularidad sean acompañados de un adjetivo, por ejemplo genético o evolutivo, que especifique el contexto particular. Este contexto es esencial para situarse y poder comprender cómo funciona el sistema modular, ya que especifica el tipo de interacciones que definen los módulos (Klingenberg 2008). Los datos morfológicos han sido usados para caracterizar módulos de desarrollo, genéticos, funcionales o evolutivos (Klingenberg 2003; Monteiro *et al.* 2005). Dentro del nivel estático es donde se estudian las diferentes formas de covariación entre rasgos morfológicos (figura 1.2); por ejemplo, la integración/modularidad del desarrollo hace referencia a interacciones entre procesos de desarrollo que dan lugar a diferentes características y, por lo tanto, producen una covariación entre ellas. Otra es la integración/modularidad funcional, que se basa en asociaciones entre partes que interactúan en un contexto funcional: los rasgos morfológicos que cumplen una función vinculada varían de manera conjunta para llevar a cabo dicha función. El componente genético de la integración y la modularidad es importante porque es un determinante

crucial del potencial de cambio evolutivo en una estructura (Klingenberg 2014). Por último, en la integración/modularidad ambiental la covariación resulta de respuestas plásticas coordinadas en varios rasgos a la variación en factores ambientales. A su vez, estos tipos de integración/modularidad para la variación morfológica influyen mutuamente a través de diversos procesos dentro de los individuos o dentro de las poblaciones (Klingenberg 2008).

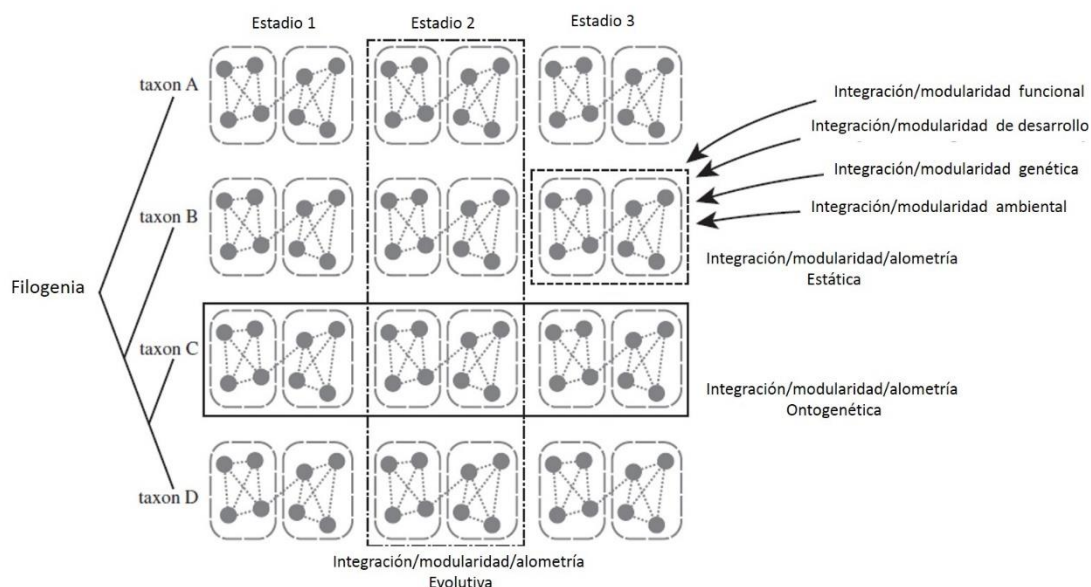


Figura 1.2 Diferentes niveles de variación. El diagrama contiene cuatro especies relacionadas, cada una con tres etapas ontogenéticas. La integración/modularidad funcional, evolutiva, genética y ambiental generalmente se estudia en un contexto estático, es decir, en una etapa ontogenética particular para una especie determinada. Modificado de Klingenberg 2014.

La hipótesis de modularidad ambiental puede corroborarse si la covariación entre configuraciones de *landmarks* pertenecientes a módulos potenciales es más débil que la covariación para otras particiones de *landmarks* de tamaño similar (igual o similar cantidad de *landmarks*) a los seleccionados *a priori* (Drake y Klingenberg 2010; Klingenberg 2003). Dicho de otro modo, si la hipótesis de modularidad es lo suficientemente sólida, la covariación entre los subconjuntos planteados *a priori* debiera ser inferior a la de diferentes subdivisiones de la misma cantidad de *landmarks* creadas al azar reflejando, de esta manera, una relativa independencia entre los módulos.

Los tres niveles descriptos (ontogenético, evolutivo y estático) no son los únicos niveles de variación; la covariación fenotípica también puede surgir de una manera diferente, sin interacciones directas, si las partes se desarrollan por separado pero varían conjuntamente, porque responden al mismo factor genético o ambiental (Klingenberg *et al.* 2001). Una manera sencilla de eliminar los efectos de la variación genética y ambiental entre los individuos y al mismo tiempo centrarse en la variación dentro de las vías de desarrollo consiste en estudiar la asimetría que presentan los organismos (Klingenberg 2003). La simetría se clasifica en dos categorías: simetría de pares (*matching symmetry*), cuando hay pares de estructuras separadas en los lados izquierdo y derecho, como por ejemplo las valvas del mejillón, y simetría de objeto (*object symmetry*), cuando hay una sola estructura internamente simétrica, como el cráneo de un mamífero (Mardia *et al.* 2000; Savriama y Klingenberg 2011). Dentro de la simetría, pueden distinguirse tres patrones de variación de las diferencias entre los lados derecho e izquierdo (figura 1.3) (Palmer 1994): si la variación se distribuye normalmente alrededor de una media de cero, se la conoce como asimetría fluctuante (AF), si la variación se distribuye normalmente alrededor de una media que es significativamente diferente de cero se denomina asimetría direccional (AD) y cuando la distribución de frecuencias se aleja de la normalidad, siendo platykurtosis o bimodal, se la conoce como antisimetría (AA). Los tipos de asimetría tienen diferentes propiedades estadísticas, así como distintos orígenes e implicaciones biológicas (Klingenberg 2015). Además, estos tres tipos de asimetrías pueden aparecer juntas en el mismo rasgo (Valen 1962).

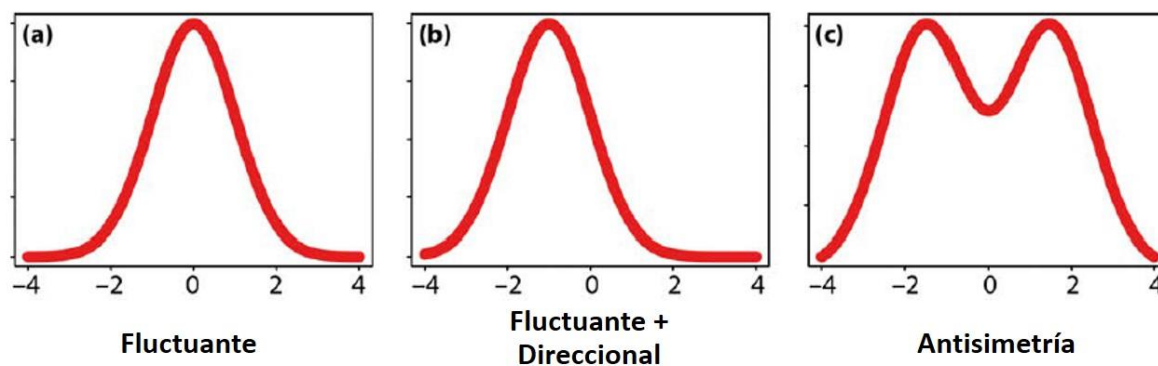


Figura 1.3 Patrones observables en la distribución de las diferencias izquierda-derecha en las poblaciones. a) Asimetría fluctuante (AF): desviaciones azarosas entre las estructuras izquierda-derecha, b) Asimetría fluctuante + asimetría direccional (AD): desviaciones sistemáticas entre lados derecho e izquierdo, c) Antisimetría (AA): poblaciones con la mayoría de los individuos asimétricos pero difieren en las direcciones de las asimetrías. Modificado de Palmer 1994.

Una manera sencilla de eliminar los efectos de la variación genética y ambiental entre los individuos y al mismo tiempo centrarse en la variación dentro de las vías de desarrollo consiste en analizar la AF (Klingenberg 2003). La AF refleja el estado de adaptación y coadaptación de una población (Graham *et al.* 2010) y se considera una medida de la inestabilidad del desarrollo (ID) (Graham *et al.* 2010; Klingenberg *et al.* 1998; Lajus *et al.* 2015; Savriama y Klingenberg 2011). La AF se utiliza como una aproximación de la inestabilidad del desarrollo ya que ambos lados de un organismo se pueden ver como réplicas independientes del mismo evento de desarrollo (Dongen 2006). Además, debido a que se cree que la AF se origina a partir de perturbaciones aleatorias de los procesos de desarrollo (Klingenberg 2003) es que se asume que la variación surge dentro de las propias vías de desarrollo. Ambas partes comparten el mismo genotipo y, en un ambiente homogéneo, están bajo la influencia de los mismos factores externos. Además, si dos rasgos comparten una vía de desarrollo determinada, las mismas perturbaciones pueden tener un efecto en los dos caracteres al mismo tiempo y, por lo tanto, puede generar una correlación entre sus asimetrías. Debido al origen azaroso y local de las irregularidades del desarrollo que producen AF, las asimetrías sólo se correlacionan entre los rasgos si las partes respectivas están vinculadas al desarrollo, es decir, si una perturbación que afecta a un rasgo se transmite también a los demás. Por lo tanto, las correlaciones de AF se limitarán

principalmente al interior de los módulos de desarrollo, mientras que las correlaciones entre los individuos se producirán igualmente en y entre módulos (Klingenberg *et al.* 2001). Según Markow (1995), la estabilidad del desarrollo es la situación que se logra cuando un organismo se ha protegido adecuadamente contra las perturbaciones epigenéticas, mostrando su fenotipo programado para el desarrollo. Cuando un organismo no ha podido amortiguar tales perturbaciones, puede mostrar signos de ID. Los organismos que experimentan estrés ambiental tienen una menor estabilidad de desarrollo y exhiben mayores niveles de AF (Leamy y Klingenberg 2005; Palmer 1994). Por lo tanto, la AF a menudo se monitorea para detectar poblaciones bajo estrés (Lajus *et al.* 2015) y se ha correlacionado con el estrés fisiológico causado por condiciones ambientales extremas (Beardmore 1960; Briones y Guiñez 2005; Hosken *et al.* 2000).

Así, el objetivo de este capítulo fue analizar la variación de la forma de la valva del mejillón *Mytilus edulis* procedente de bancos naturales y cultivados de cada una de las zonas productivas de la provincia de Chubut. De esta manera se busca conocer el morfoespacio del mejillón de la provincia de Chubut, representando las tendencias de la variación morfológica para entender algunos de los procesos biológicos que la generan.

1.2 Materiales y Métodos

La alometría puede afectar a todas las partes del organismo y por ende puede interferir en el análisis de modularidad, ocultando una posible estructura modular (Klingenberg 2009). Por lo tanto, en primer lugar, se estimó la alometría a través de una regresión multivariada de la forma (coordenadas de Procrustes alineadas, como variable dependiente) sobre el tamaño (*centroid size*, como variable independiente) (Bookstein 1991; Monteiro 1999). Después de eliminar la influencia del tamaño sobre la forma, utilizando los residuales de la regresión como nuevas variables de forma libres de alometría, se calcularon las matrices de varianzas-covarianzas para realizar el test de modularidad y se puso a prueba la hipótesis de que las configuraciones de *landmarks* interna y externa son módulos independientes (figura 1.4) usando el coeficiente RV de Escoufier (Escoufier 1973).

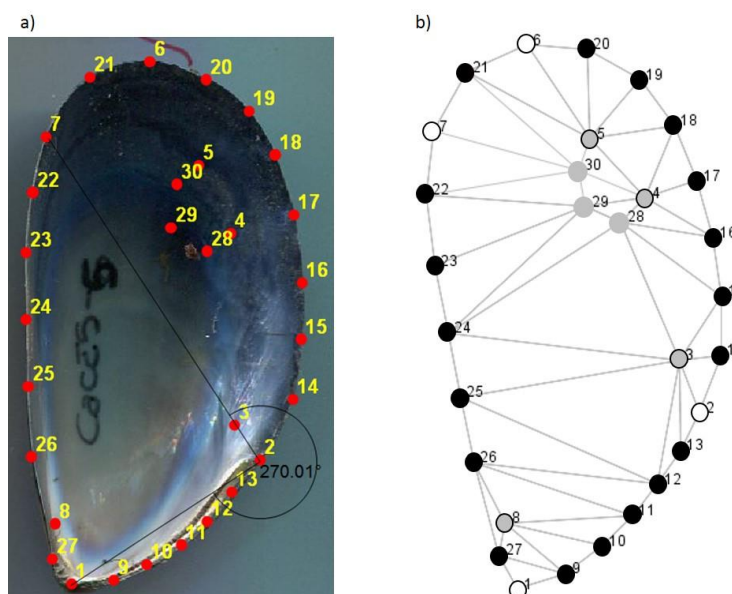


Figura 1.4 Configuración de *landmarks* y *semilandmarks*, a) Configuración de *landmarks* y *semilandmarks* digitalizados sobre la valva derecha (para el análisis de asimetría se repitió esta configuración sobre la valva izquierda). Posición de los 8 *landmarks*: (1) umbo, (2) ligamento, (3) cicatriz del músculo retractor del pie, (4) y (5) cicatriz músculo aductor posterior, (6) máxima curvatura borde posterior, (7) proyección, (8) cicatriz músculo aductor anterior. Para mejorar la precisión en la digitalización, los *landmarks* fueron marcados previamente con un marcador indeleble sobre la valva. b) Partición de la configuración en dos conjuntos según su localización en la valva: interna (4) *landmarks*: puntos grises con borde negro; *semilandmarks*: puntos grises) y externa (4 *landmarks*: puntos blancos con borde negro; 19 *semilandmarks*: puntos negros). Las líneas grises representan el gráfico de adyacencia utilizado para definir particiones espacialmente continuas de *landmarks* en la prueba de modularidad (Klingenberg 2009).

Una vez confirmada la independencia entre los módulos, sobre cada uno se evaluó la alometría y se puso a prueba la presencia de dimorfismo sexual mediante la determinación de las máximas diferencias en la forma de la valva entre machos y hembras utilizando un análisis discriminante. A su vez, se puso a prueba la diferencia de medias entre los sexos, con una prueba de T^2 de Hotelling con inferencia mediante una prueba por permutación con 10.000 repeticiones. A continuación, sobre las matrices de varianzas-covarianzas para cada módulo se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para determinar sus respectivos morfoespacios. Las variaciones de forma se visualizaron mediante el uso de gráficos de polígonos entre los *landmarks* (de ahora en adelante, *wireframes*), que ayuda a visualizar el cambio de forma entre el consenso (promedio) y un

punto sobre el eje de variación que se quiera representar (forma objetivo). Tales gráficos se muestran solo para los dos primeros ejes de variación.

Dado que la asimetría fluctuante (AF) expresa la diferencia entre estructuras simétricas de un individuo fue necesario digitalizar ambas valvas de cada individuo. Para el estudio de las asimetrías, entonces, se decidió trabajar sobre una sub muestra, eligiendo dos localidades: Camarones y Comodoro (Tabla 1.1) y dentro de estas un cultivo en *longline* y un banco natural. Así, las comparaciones de asimetría se realizaron entre los hábitats intermareal (banco natural) y submareal (cultivo en *longline*) de 4 sitios de muestreo (tabla 1.1): CaBN, CaCS, CoBN, CoCM.

Tabla 1.1 Número de individuos muestreados para el estudio de asimetría fluctuante. Referencia: RiCC (Riacho Cultivo), RiBN (Riacho Banco Natural), CaCS (Camarones Cultivo Stephane), CaCE (Camarones Cultivo Escuela), CaBN (Camarones Banco Natural), CoCM (Comodoro Cultivo ACC), CoCE (Comodoro Cultivo Escuela) y CoBN (Comodoro Banco Natural).

Muestra	N
CaBN	114
CaCS	107
CoBN	116
CoCM	115

El proceso de digitalización fue igual al explicado en la sección metodología general: se realizó la digitalización al azar entre todos los individuos, de las valvas derechas e izquierdas. Para llevar a cabo el análisis de AF se registraron las siguientes variables de clasificación: individuos (mediante un código de identificación), lado (valva izquierda o derecha) y réplica (digitalización duplicada de cada individuo para poder calcular el error de medición, ya que este puede tener efectos en las estimaciones de AF, (Klingenberg 2015). Previamente al estudio de asimetría se evaluó la alometría y la modularidad. Tradicionalmente, los análisis de AF han utilizado el ANOVA de dos factores (Leamy 1984; Palmer y Strobeck 1986) con individuos y lados como factores fijo y aleatorio respectivamente, a su vez Goodall (1991) estableció el uso del ANOVA en el contexto del método de Procrustes. El Procrustes ANOVA (Klingenberg y McIntyre 1998) utiliza las coordenadas de *landmarks* después de la

superposición de Procrustes entre todos los datos (todos los individuos, ambos lados, todas las réplicas) (Dryden y Mardia 1998; Klingenberg 2015; Klingenberg y McIntyre 1998) como variables de forma a comparar. Así, las desviaciones del consenso se descomponen en un componente de variación entre individuos y un componente de asimetría izquierda-derecha (Klingenberg 2015). En presencia de estructuras con simetría de pares, las unidades de análisis son las partes repetidas de las estructuras dentro de cada uno de los factores e interacciones dentro de un Procrustes ANOVA. Por lo tanto, como resultado de este análisis se obtiene una tabla con los siguientes términos (Klingenberg 2015; Savriama y Klingenberg 2011):

- Individuo: representa la variación entre individuos, y se calcula a partir de un promedio de los lados izquierdo y derecho para cada individuo en la muestra.
- Lado: representa a la asimetría direccional, la desviación del valor central de la asimetría promedio en la muestra.
- Ind. * Lado: representa a la asimetría fluctuante, entendida como las diferencias en la varianza entre los lados derecho e izquierdo de rasgos simétricos, dentro de cada individuo.
- Error de medición (EM): es la variación entre las medidas repetidas.
- Efecto adicional: Se incluyó en este ítem a la variable hábitat-localidad (donde los hábitats son Banco natural / Cultivo *longline* y las localidades son Camarones / Comodoro).

Dado que el interés está en estudiar la asimetría, los componentes de la variación simétrica no fueron tenidos en cuenta en los análisis. Los patrones de variación de forma de AF se visualizaron mediante la utilización del análisis de PCA de la matriz de varianza-covarianza respectiva (Ind. * Lado). Debido a que para medir asimetría, la forma más directa es la distancia de Procrustes entre los lados izquierdo y derecho (Klingenberg 2015; Klingenberg y McIntyre 1998; Smith *et al.* 1997), los niveles de AF se evaluaron usando los valores de AF (*FA Score*, del Procrustes ANOVA). Como los supuestos para las pruebas paramétricas no se cumplieron, la significancia estadística de la igualdad entre los valores de AF se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Zar 1999). De acuerdo con Conover (1999), para reconocer cuales de los grupos difieren cuando la prueba de hipótesis es significativa (*P*

<0,05) se realizaron comparaciones de a pares entre todos los grupos. Las medias de los valores de AF se utilizaron para ilustrar las diferencias de forma entre las localidades y el hábitat. Todos los análisis estadísticos multivariantes se llevaron a cabo en el *software* MorphoJ versión 1.06d (Klingenberg 2011).

1.3 Resultados

La regresión multivariada entre forma y tamaño fue significativa ($P < 0,0001$) para toda la muestra, y representó el 2,75% de la variación total de la forma (figura 1.5). Si bien el cambio de tamaño explica muy poco de la variación en la forma, con el fin de eliminar cualquier efecto de alometría, se continuaron los análisis utilizando los residuos de la regresión como nuevas variables de forma. En la figura 1.5a se observa que, en general, Comodoro es la localidad con mayor variabilidad tanto en forma como en tamaño. En la figura 1.5b se muestra el mismo análisis que en la figura 1.5a pero cada sitio de muestreo está agrupado por color; allí se observa que en los valores más bajos se encuentran los ejemplares del banco natural (CoBN) a excepción de dos individuos pertenecientes a CaBN y en los valores más altos se ubica el cultivo de ACC (CoCM). En el caso de Riacho y Camarones los valores se encontraron menos dispersos.

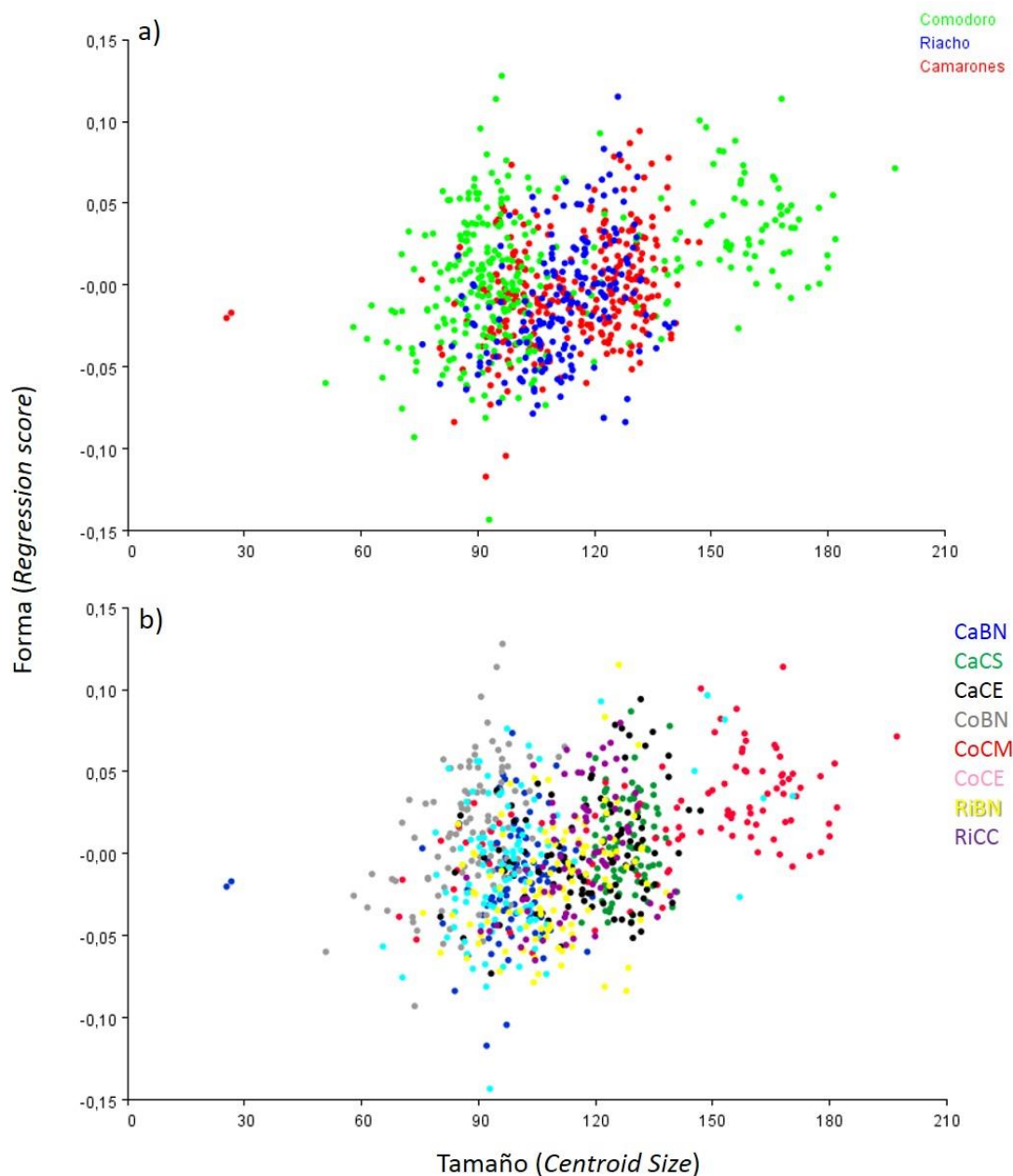


Figura 1.5 Regresión entre forma (*Regression Score*) y tamaño (*Centroid Size*), a) Agrupada por localidad (Comodoro Rivadavia en verde, Riacho San José en azul y Bahía Camarones en rojo). b) Agrupada por sitios, donde: RiCC (Riacho Cultivo), RiBN (Riacho Banco Natural), CaCS (Camarones Cultivo Stephane), CaCE (Camarones Cultivo Escuela), CaBN (Camarones Banco Natural), CoCM (Comodoro Cultivo ACC), CoCE (Comodoro Cultivo Escuela) y CoBN (Comodoro Banco Natural).

Con respecto al análisis de modularidad, el coeficiente RV entre la configuración interna y externa, con un valor de 0,33, está cerca del extremo inferior (cola izquierda) de la distribución de los coeficientes RV para todas las particiones examinadas. De hecho,

ninguna partición muestra RV menor o igual a la hipótesis planteada *a priori* (figura 1.6). Por lo tanto, las configuraciones internas y externas son módulos independientes y los análisis subsecuentes se realizaron para cada módulo por separado.

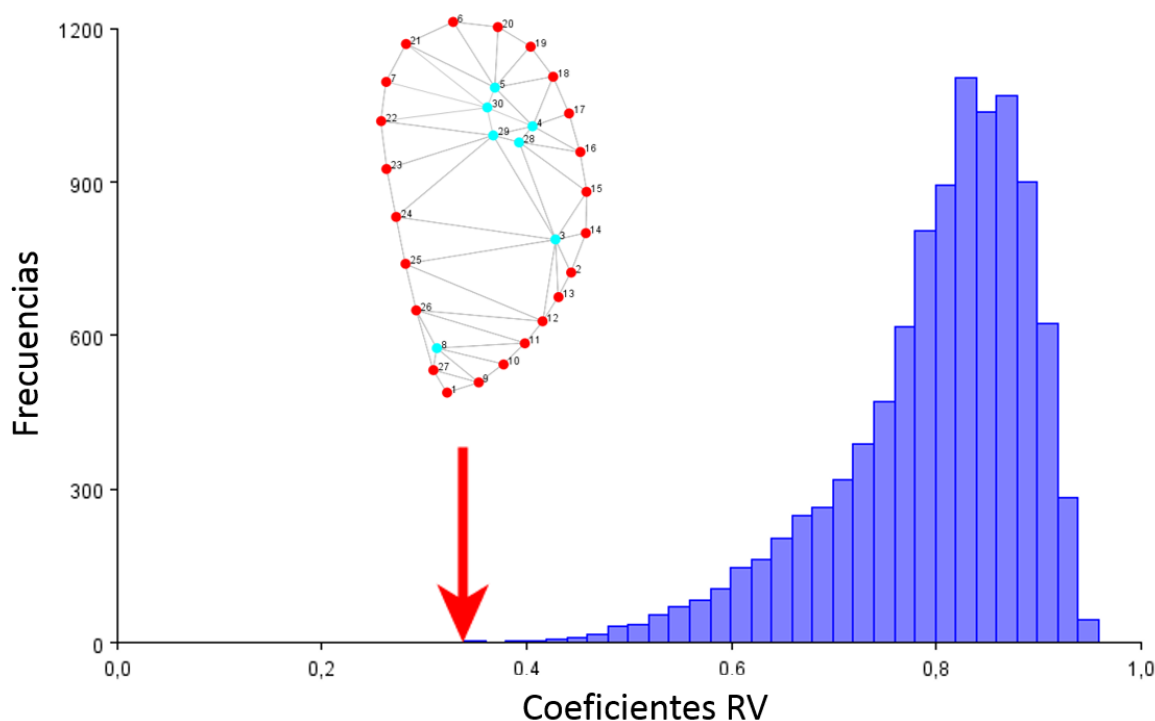


Figura 1.6 Histograma de distribución de los coeficientes RV para todas las particiones evaluadas. La flecha roja indica el coeficiente más bajo (0,33) que corresponde a la hipótesis planteada *a priori*, donde la configuración fue separada en dos conjuntos: interna (puntos celestes) y externa (puntos rojos).

El análisis discriminante para la comparación entre machos y hembras fue no significativo (Externo: $T^2 = 35,58$, $P = 0,8108$; Interno: $T^2 = 1,8731$, $P = 0,9973$). Por lo tanto, todos los análisis posteriores se realizaron sin correcciones por dimorfismo sexual. Los resultados de la regresión entre tamaño y forma (alometría) dentro de cada módulo fueron significativos ($P < 0,0001$) y representaron el 1,69% y 1,17% de la variación total de la forma para los módulos externo e interno respectivamente.

La representación del espacio de variación de la forma del mejillón del Chubut se realizó por medio de un análisis de PCA, donde los primeros 4 y 5 componentes principales

representaron más del 5% de la varianza para el módulo externo e interno respectivamente (tabla 1.2).

Tabla 1.2 Componentes principales con un porcentaje de la varianza mayor al 5%.

% Varianza		
PCs	Módulo externo	Módulo interno
PC1	51,19 %	43,52 %
PC2	14,50 %	19,14 %
PC3	12,52 %	14,94 %
PC4	5,96 %	8,84 %
PC5	< 5 %	8,12 %

En el módulo externo (figura 1.7) los componentes dominantes de la variación en el extremo positivo del PC1 (51,19%) se asocian a una expansión dorsal-anterior en la zona del ligamento y un retraimiento posterior, con una expansión postero-ventral. Mientras que para los valores negativos del mismo PC la variación en forma es la contrapuesta (elongación de la zona posterior, retracción de zona dorsal-anterior) y las valvas toman formas más rectas. Por otro lado, en el PC2 (14,50%) el extremo negativo se relacionó con una forma de valva más globosa con un retraimiento del umbo, en comparación con el extremo positivo donde las valvas son más elongadas, con un desplazamiento del umbo en sentido antero-ventral y un retraimiento de la zona posterior. En el PC3, que explicó el 12,52% del total de la variación, se observan valvas con forma de “gota” hacia los valores negativos y hacia los valores positivos valvas angostas, con un retraimiento en el lado ventral.

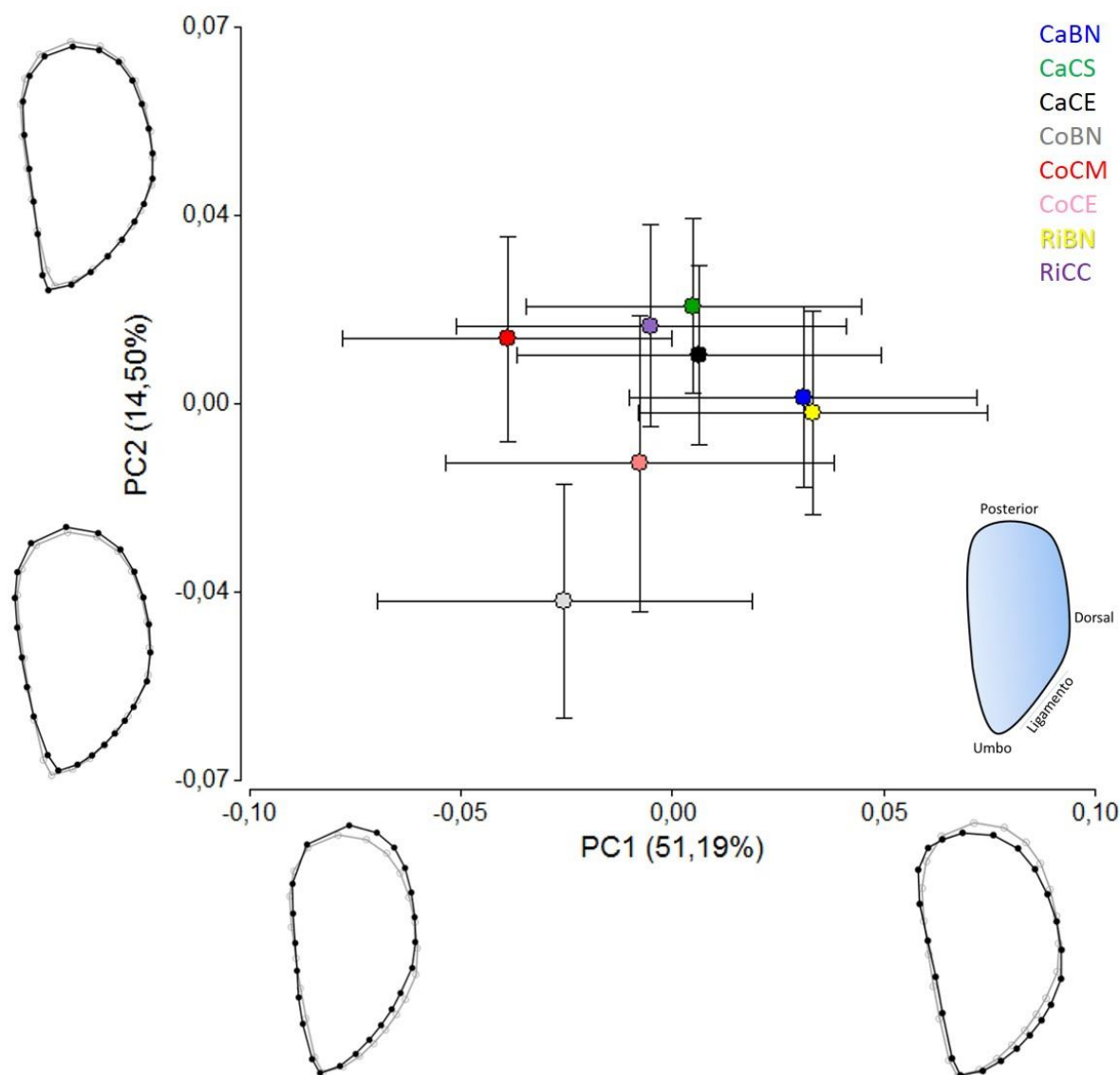


Figura 1.7 Módulo externo. Gráfico de dispersión para los dos primeros componentes principales (PC) y los porcentajes de varianza explicada por cada PC (entre paréntesis). Los círculos indican la forma media de cada sitio y las cruces el desvío estándar. Las siluetas o *wireframes* indican los extremos del cambio en la forma de la configuración externa (en negro la forma objetivo y en gris el consenso). Se utilizó un factor de escala $\pm 0,1$ para el PC1 y $\pm 0,05$ para el PC2 para representar los cambios en forma. RiCC (Riachó Cultivo), RiBN (Riachó Banco Natural), CaCS (Camarones Cultivo Stephane), CaCE (Camarones Cultivo Escuela), CaBN (Camarones Banco Natural), CoCM (Comodoro Cultivo ACC), CoCE (Comodoro Cultivo Escuela) y CoBN (Comodoro Banco Natural).

Las características dominantes de variación en el módulo interno representadas por el PC1 (43,52%; figura 1.8) están asociadas, en los valores positivos, con una restricción del músculo aductor posterior y un desplazamiento antero-dorsal en la cicatriz del músculo retractor del pie. El segundo eje de variación explica el 19,14% de la variación total y está

asociado, en su extremo negativo, a un mayor desarrollo de la cicatriz del músculo aductor posterior, un desplazamiento dorsal en la posición del músculo retractor del pie y un movimiento hacia el borde ventral del músculo aductor anterior. Por el contrario, hacia el extremo positivo del PC2, se observa una cicatriz del músculo aductor menos desarrollada, el músculo retractor del pie se desplaza en sentido ventral, mientras que el músculo aductor anterior hacia la parte dorsal. El PC3 explica el 14,94% de la variación total y está asociado a una rotación hacia la parte dorsal de la cicatriz del músculo aductor posterior y de la cicatriz del músculo retractor del pie, con un sutil desplazamiento ventral del músculo aductor anterior.

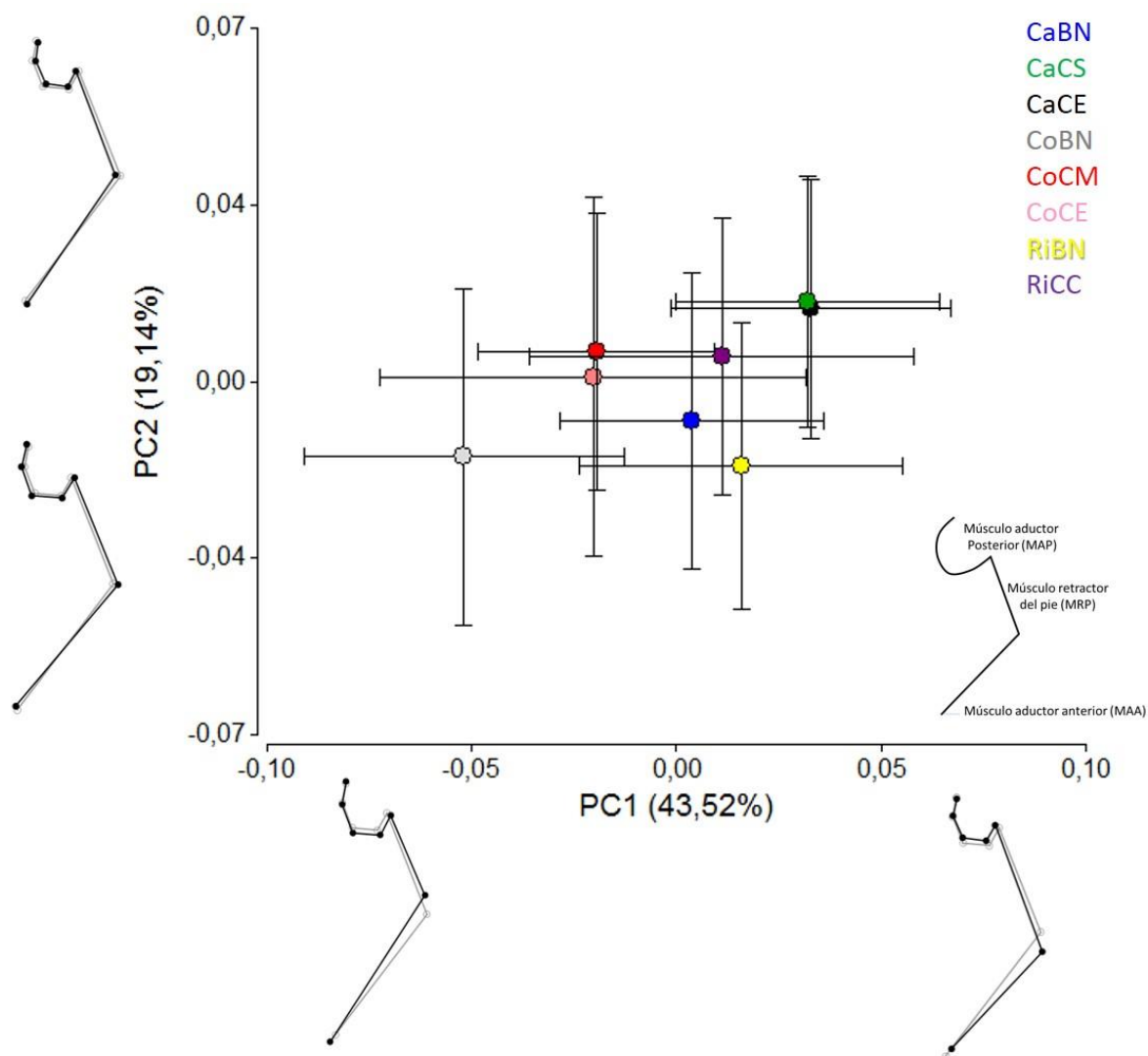


Figura 1.8 Gráfico de dispersión para los primeros tres componentes principales (PC) y los porcentajes de varianza explicada por cada PC (entre paréntesis). Los círculos indican la media por sitio y las cruces el desvío estándar. Las siluetas o *wireframes* indican los extremos del cambio en la forma de la configuración externa (en negro la forma objetivo y en gris el consenso). Se utilizó un factor de escala de $\pm 0,1$ para el PC1 y $\pm 0,05$ para el PC2, para representar los cambios en forma. RiCC (Riacho Cultivo), RiBN (Riacho Banco Natural), CaCS (Camarones Cultivo Stephane), CaCE (Camarones Cultivo Escuela), CaBN (Camarones Banco Natural), CoCM (Comodoro Cultivo ACC), CoCE (Comodoro Cultivo Escuela) y CoBN (Comodoro Banco Natural).

En la figura 1.9 se resume la variación en la forma de ambos módulos (interno y externo) expresada en los tres primeros ejes de variación, mediante un gráfico de *wireframe*. Se utilizó un factor de escala de $\pm 0,1$ para todos los ejes, con el objeto de poder observar levemente magnificadas las direcciones del cambio en la forma.

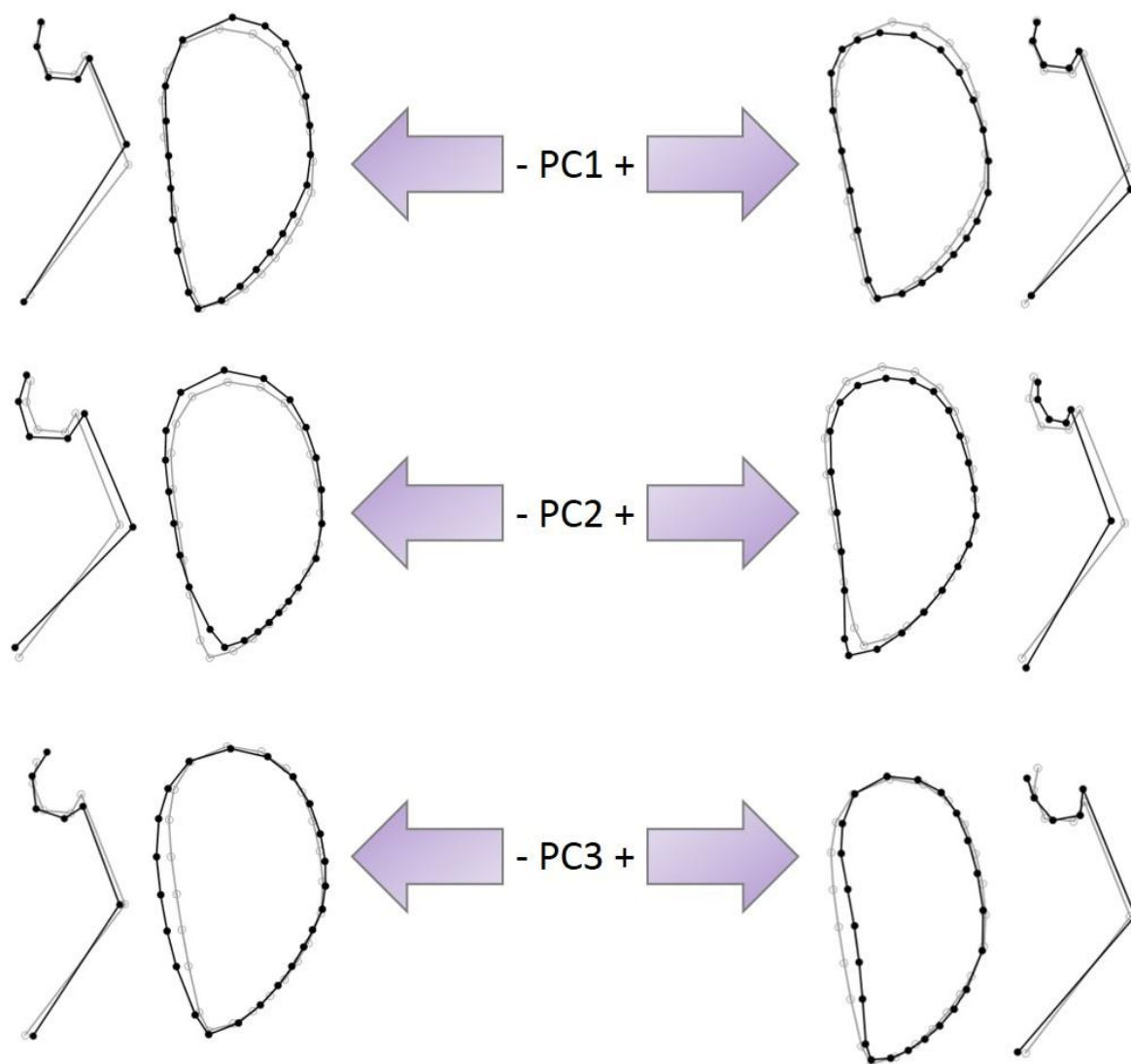


Figura 1.9 Siluetas o *Wireframes* (factor de escala de ± 0.1) correspondientes a los 3 primeros PC. En gris se muestra la configuración consenso y en negro la forma objetivo.

Todos los efectos del modelo del Procrustes ANOVA fueron estadísticamente significativos (tabla 1.2). Por lo tanto, la forma de la valva presenta AD (Lado) y AF (Ind.*Lado) en cada módulo. El error de medición fue insignificante en relación a la AF dado que el cuadrado medio de AF superó en gran medida al del error de medición (tabla 1.3) (Klingenberg 2015) en ambos módulos.

Tabla 1.3 Resultados del Procrustes ANOVA para las asimetrías en cada configuración. Se muestran los cuadrados medios (CM), los grados de libertad (gl), así como los valores *P*, para todos los efectos.

	Módulo					
	Interno			Externo		
<i>Shape (Procrustes ANOVA)</i>	CM	gl	<i>P</i>	CM	gl	<i>P</i>
Hábitat - Sitio	0.043783778	30	< .0001	0.012844727	126	< .0001
Individuo	0.000548149	3860	< .0001	0.000179613	16338	< .0001
Lado	0.003651373	10	< .0001	0.005082192	42	< .0001
Ind.*Lado	0.000264705	3898	< .0001	1.28221E-05	16464	< .0001
Error	5.28083E-05	1160		6.7795E-06	4956	

La presencia de AD y AF también se observó en el histograma de frecuencias de los valores de AF, donde las diferencias entre la valva izquierda y derecha están distribuidas alrededor de una media distinta de cero (figura 1.10). Además, del análisis de dicho histograma se desprende la ausencia de antisimetría en la muestra, dado que no existen distribuciones binomiales de los valores de AF.

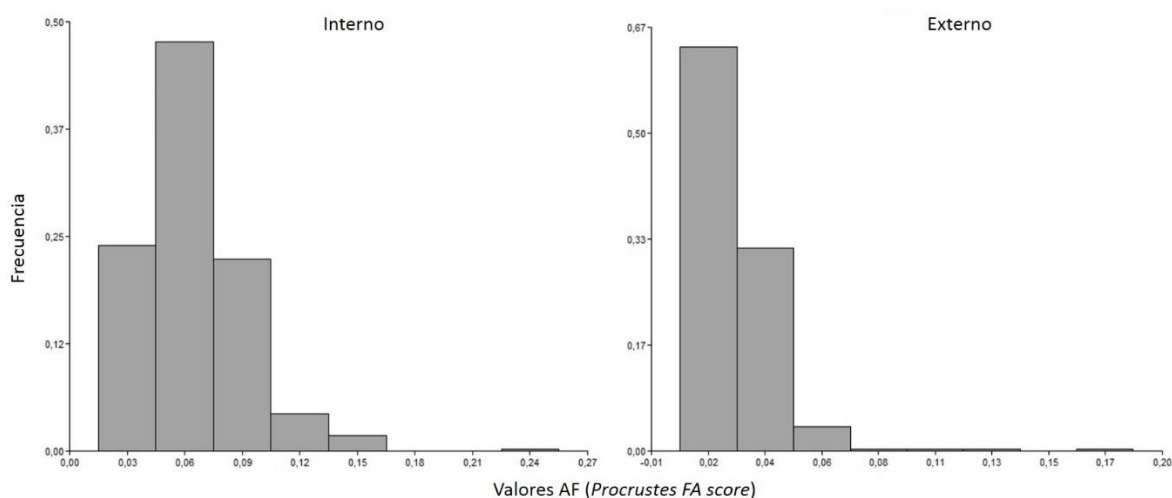


Figura 1.10 Histograma de frecuencias para los valores de AF (*Procrustes FA score*), diferencias entre derecha (D) e izquierda (I) en la muestra. Las distribuciones de D - I están alrededor de una media que es diferente de cero (desviado de AF ideal), lo que indica la presencia de asimetría direccional y fluctuante.

Se realizó un *PCA* sobre la matriz de varianza-covarianza correspondiente al ítem Ind.*Lado para identificar y mostrar los patrones de variación de forma debidos a la AF (figura 1.11). Los tres primeros PC del módulo externo e interno explicaron el 83,14% y el 83,08% respectivamente. El primer eje de variación (PC1) en cada módulo explicó más de la mitad

de la varianza (externo: 53,09%; interno: 52,77%). Se describe la variación de forma hacia los valores extremos positivos; el desplazamiento es el contrario en los valores extremos negativos. En el módulo externo, la variación en forma se asoció con valvas más rectas con una elongación de la región posterior de la valva y con una curvatura de la región antero-dorsal. Por su parte la variación en el módulo interno del PC1 estuvo asociada a la expansión del músculo aductor posterior y a un desplazamiento de la cicatriz del músculo retractor del pie hacia la zona dorsal.

Por otro lado, el PC2 en el módulo externo explicó el 20,56% del total de la varianza y estuvo asociado con valvas rectas. En el módulo interno este eje de variación explicó el 19,63% y se asoció con un músculo retractor del pie más constreñido y un leve corrimiento anterior del músculo aductor anterior. Por último, el PC3 en el módulo externo explicó el 9,5% de la varianza y estuvo asociado a valvas estrechas. Mientras que en el módulo interno este eje explicó el 10,69% del total de la varianza, observando un desplazamiento dorsal del músculo retractor del pie.

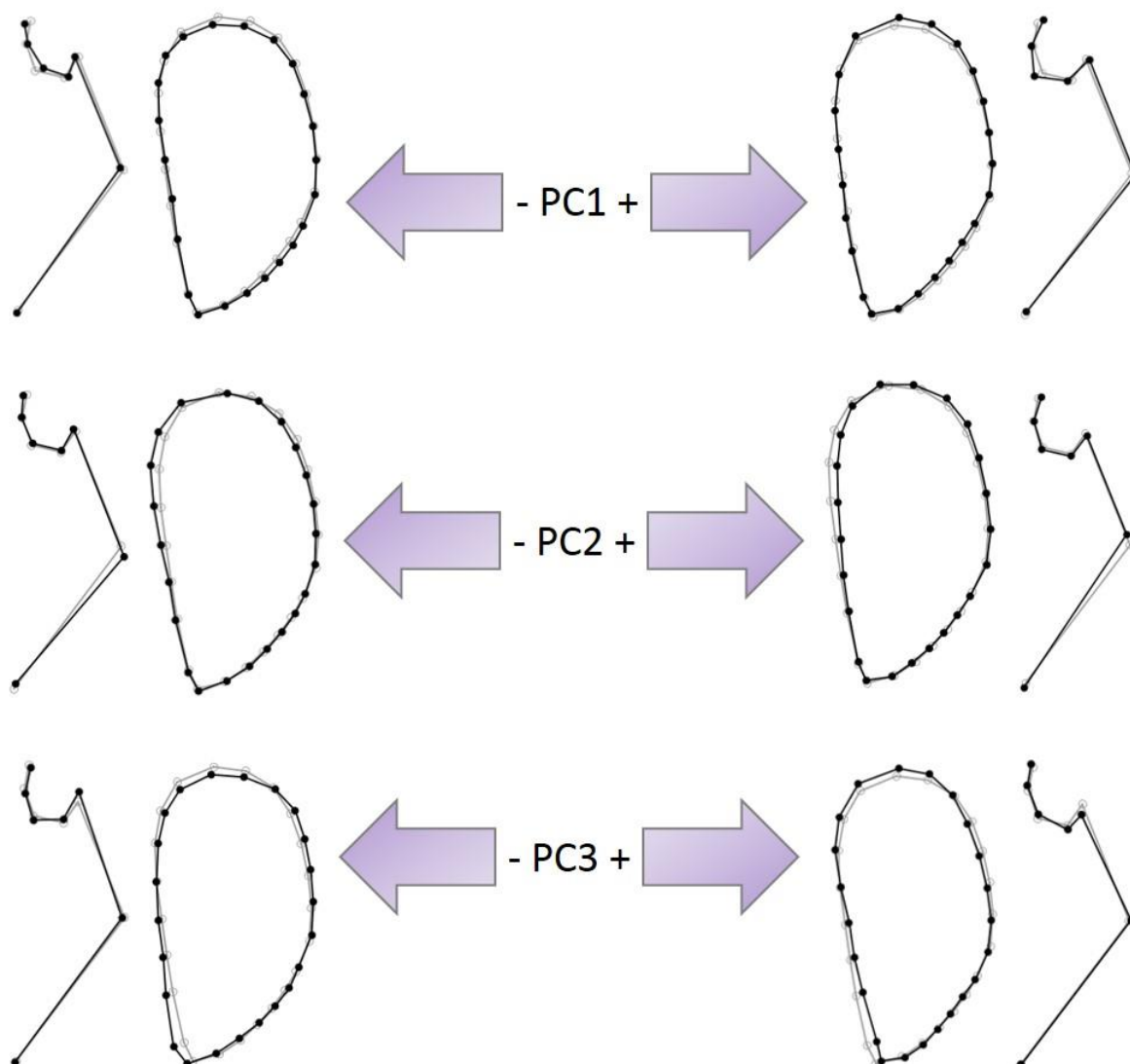


Figura 1.11 Wireframes (factor de escala de $\pm 0,05$) correspondientes al PCA sobre la matriz de varianza – covarianza del ítem correspondiente a la asimetría fluctuante (Ind.*Lado). En gris se muestra la configuración consenso y en negro la forma objetivo.

Los valores de AF resultantes del Procrustes ANOVA para cada módulo difieren significativamente entre sitios (Externo: Kruskal-Wallis: $H= 39,21$, $P< 0,0001$; Interno: Kruskal-Wallis: $H= 42,89$; $P< 0,0001$; figura 1.12). Los mejillones procedentes de los bancos naturales intermareales presentaron mayores niveles de AF que los mejillones de los cultivos submareales y, dentro de los bancos naturales, la media del valor de AF para Comodoro fue mayor que para Camarones.

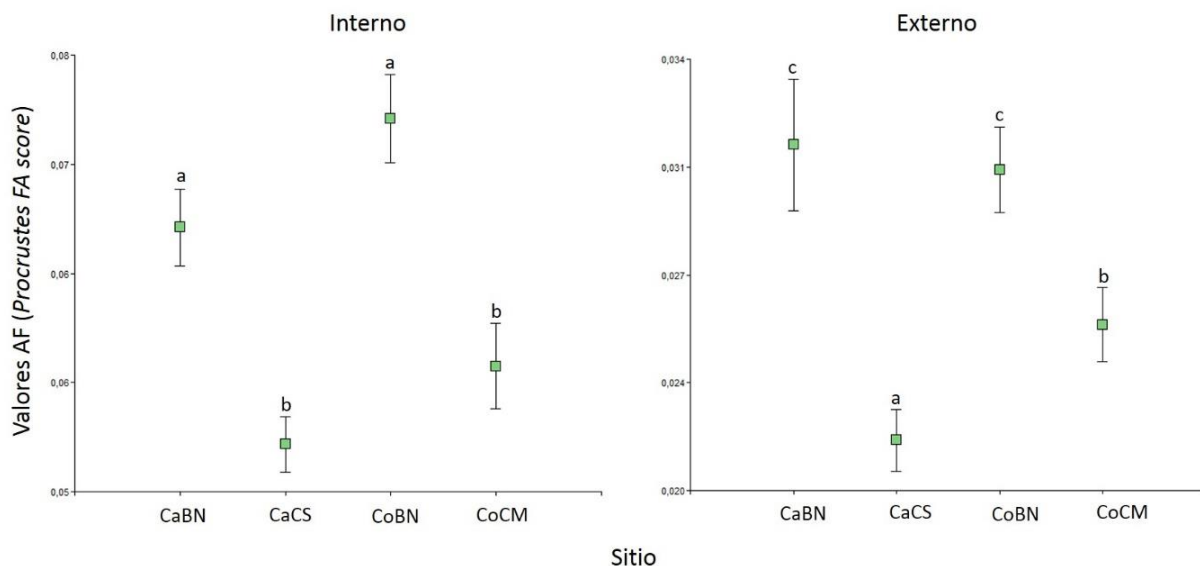


Figura 1.12 Medias y desvíos estándar de los valores individuales de AF de los mejillones según sitios de muestreo de las localidades de Comodoro y Camarones, para el módulo interno y externo. Dónde: CaBN (Camarones Banco Natural), CaCS (Camarones Cultivo Stephane), CoBN (Comodoro Banco Natural) y CoCM (Comodoro Cultivo ACC).

1.4 Discusión

El interés general de esta tesis es conocer, entender y discutir el uso de la variación en la forma de la valva del mejillón chubutense. Mediante este camino lógico se espera poder distinguir mejillones según su sitio de procedencia de las distintas localidades productivas del Chubut, y así utilizar la forma de la valva como biomarcadora de procedencia. En este primer capítulo, el objetivo fue conocer el morfoespacio del mejillón chubutense, estudiando los efectos de diferentes procesos biológicos que afectan la forma, como son la alometría, modularidad, el dimorfismo sexual y la simetría.

El método más directo para estudiar alometría, con datos provenientes de morfometría geométrica es la regresión multivariada entre las variables de forma y el tamaño (Monteiro 1999). Se determinó la presencia de alometría mediante este análisis, demostrando que existe una leve influencia del tamaño en la forma; sin embargo, la misma fue corregida utilizando los residuales de la regresión. La corrección de la alometría reduce la covariación de la valva del mejillón y acentúa la independencia relativa de los módulos interno y externo. Este resultado ya ha sido evidenciado para otras especies de mejillones, que

demuestran que la forma en el mejillón cambia a medida que su tamaño se incrementa (Alunno-Bruscia *et al.* 2001; Seed 1968).

En los últimos años, con la intención de abordar múltiples preguntas biológicas desde diferentes perspectivas, se han aplicado técnicas de morfometría geométrica en mejillones utilizando tanto configuraciones de *landmarks* (Scalici *et al.* 2017; Trovant *et al.* 2018; Valladares *et al.* 2010) como análisis elíptico de Fourier (Krapivka *et al.* 2007; Moschino *et al.* 2015; Savoya *et al.* 2015; Telesca *et al.* 2018). Sin embargo, muchas de las configuraciones de *landmarks* utilizadas no evaluaron la existencia de distintos módulos. Delimitar módulos y examinar su correspondencia con características anatómicas es esencial para comprender el desarrollo y la evolución de las estructuras morfológicas (Klingenberg 2003). Por lo tanto, en esta tesis, dado que la configuración de *landmarks* planteada hace referencia a distintas estructuras de la anatomía del mejillón, con diferentes funciones y probablemente de diversos orígenes embrionarios, se decidió evaluar la presencia de dos módulos, uno interno y otro externo. Estas dos configuraciones de *landmarks* representan diferentes rasgos en la valva: la configuración externa se centra únicamente en el contorno de la valva (estructura dura), mientras que la configuración interna hace referencia a las cicatrices de las partes blandas (estructura blanda). Así, se puso a prueba la hipótesis de modularidad para garantizar que se trate de una configuración sin la presencia de módulos, los cuales podrían estar afectados por el ambiente de forma independiente, enmascarando patrones de variación en la forma (Bieler *et al.* 2013). Este tipo de enfoque ha sido propuesto durante la 77ª Reunión Anual de la *American Malacological Society* donde quedaron registradas, en un documento (*Bivalvia—A discussion of known unknowns*) elaborado por Bieler *et al.* (2013), diferentes preguntas sin respuesta referidas a los bivalvos. Uno de los interrogantes planteados está referido particularmente a la modularidad y/o integración morfológica, dado que se espera que las estructuras dentro de un módulo presenten una covarianza más alta que las estructuras entre diferentes módulos. Asimismo, cabe destacar que el análisis de modularidad aplicando morfometría geométrica desarrollado en esta tesis es pionero en bivalvos en

general y a la valva del mejillón en particular. Por lo tanto, el resultado obtenido en este capítulo respecto de la independencia de los dos módulos planteados es innovador y es un antecedente a tener en cuenta a la hora de diseñar la configuración de *landmarks* a utilizar en futuros estudios.

El dimorfismo sexual se puede definir como una diferencia sistemática en los rasgos fenotípicos entre individuos de diferente sexo en la misma especie (Shine 1989). La mayoría de los bivalvos son dioicos, es decir, los sexos están separados y, generalmente, hay una misma proporción de machos y hembras (Gosling 2003). Sin embargo, es conocido que solo algunas pocas especies de bivalvos presentan dimorfismo sexual externo extremo, como por ejemplo el bivalvo escabador *Zachsia zenkewitschi* donde los machos son enanos (Shipway et al 2016). Existen escasos antecedentes de dimorfismo sexual en la forma de la valva tanto en bivalvos como en gasterópodos. Por ejemplo, en el bivalvo de agua dulce *Diplodon chilensis*, se evaluó el dimorfismo sexual utilizando una configuración con *landmarks* internos y externos y no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras (Yusseppone et al. 2018). En el mejillón de agua dulce *Anodonta anatina*, se estudiaron 5 poblaciones, y solo en 3 se encontró dimorfismo sexual, donde las hembras presentaron valvas significativamente más anchas que las de los machos (Zieritz y Aldridge 2011). En el gasterópodo marino *Buccinanops globulosus* se pudo determinar la presencia de dimorfismo sexual utilizando morfometría geométrica en 3D, donde se observó que el cayo de la concha, área donde las hembras acarrean las capsulas de huevos en época reproductiva, es más delgado y chato en machos y hembras juveniles, mientras que las hembras adultas presentan cayos robustos e inflados (Márquez y Averbuj 2017). En este capítulo no se encontró dimorfismo sexual en la forma de la valva en el mejillón *M. edulis*. El dimorfismo sexual utilizando la forma de la valva no ha sido evaluado, en otro mejillón perteneciente al género *Mytilus*.

Respecto a la configuración del morfoespacio delimitado por la forma de las valvas del mejillón de la provincia del Chubut, el eje de mayor variación explicada de la configuración externa hace referencia a la curvatura, donde se produce un achatamiento en la zona

posterior y una expansión en la zona del ligamento. Mientras que sobre la configuración interna la principal variación se observa en el largo de la cicatriz del músculo retractor del pie y en la expansión/retracción de la cicatriz del músculo aductor posterior. Al analizar cómo se distribuye la variación de la forma en la muestra, se observa que las valvas más globosas y con músculo aductor posterior menos desarrollado coinciden con las muestras provenientes de los cultivos y, por el contrario, las valvas más elongadas con umbos más puntiagudos y cicatriz del músculo aductor posterior más desarrollada estarían asociadas a las valvas de los mejillones de los bancos naturales. De todos modos, este análisis se desarrolla con mayor precisión en el siguiente capítulo. Estos resultados coinciden con los encontrados por Valladares *et al.* (2010), quienes registraron en los mejillones procedentes de bancos naturales valvas con un borde ventral cóncavo, desplazamiento del umbo hacia el borde ventral (haciendo a la valva más recta) y un músculo aductor más grande en comparación con mejillones de cultivo. Cabe destacar que la configuración de *landmarks* empleada por estos autores implica puntos internos y externos, sin diferenciarlos. Por su parte, Telesca *et al.* (2018) encontraron valvas más alargadas, estrechas y con márgenes dorsoventrales paralelos en sitios de baja salinidad. Respecto de una variación morfológica latitudinal, Krapivka *et al.* (2007) distinguieron morfológicamente a mejillones procedentes de distintos sectores de la isla de Chiloé de mejillones de la zona norte de Chile y vieron que los valores positivos del primer eje de variación, donde se ubicaban los grupos de Chiloé, mostraban valvas ventralmente más convexas, mientras que para los valores negativos las valvas eran cóncavas antero-ventralmente con umbo puntiagudo.

Los métodos para el análisis de formas de los objetos que presentan simetría bilateral pueden separar el componentes de variación simétrica, la variación en los promedios izquierda-derecha entre individuos, de un rasgo del componente de asimetrías izquierda-derecha dentro de los individuos (Klingenberg *et al.* 2002). El análisis empleado en este capítulo para explorar las asimetrías en las valvas de mejillón fue el Procrustes ANOVA, con individuo y lado como efecto principal. Asimismo, este análisis brinda la oportunidad de detectar el efecto del error de medición (EM) en las estimaciones de asimetría fluctuante

(AF) (Klingenberg 2015). Para el caso del mejillón *M. edulis* fue insignificante, por lo tanto la AF tiene sentido biológico y no es producto de una mala elección de los *landmarks* y/o un defectuoso protocolo de digitalización. Al mismo tiempo, todos los ítems del Procrustes ANOVA fueron estadísticamente significativos, incluido el ítem lado, que hace referencia a la asimetría direccional (AD), aunque el posible significado funcional y adaptativo de la AD aún no está claro (Klingenberg 2015; Klingenberg y McIntyre 1998). Según Palmer (1994), la AD es genética y generalmente debería expresarse en grado similar para todos los individuos en una población (Lajus *et al.* 2015). Los mejillones se caracterizan por una alta plasticidad fenotípica en respuesta a la variación de factores ambientales y ecológicos que impactan en la morfología de su valva (Akester y Martel 2000; Beadman *et al.* 2003; Cubillo *et al.* 2012a; Funk y Reckendorfer 2008; Kirk *et al.* 2007; Steffani y Branch 2003); por lo tanto, no está del todo claro en qué medida la variación de la forma tiene una base genética directa y en qué medida es una consecuencia de los diferentes factores ambientales. De acuerdo con Klingenberg *et al.* (2002) un papel destacado de la plasticidad fenotípica también puede explicar la discrepancia en los patrones de covariación entre la variación de forma simétrica entre individuos y la AF. Luego, la plasticidad fenotípica en respuesta a la condición ambiental causaría una diferencia cualitativa entre los procesos que afectan los componentes simétricos y asimétricos de la variación (Klingenberg *et al.* 2002).

En este capítulo se compararon los niveles de AF de mejillones de dos hábitat que representan a ambientes con interacciones ecológicas bien contrastantes: el intermareal rocoso (mejillones silvestres) y el *longline* submareal (mejillones cultivados). Las costas rocosas intermareales son ambientes fluctuantes caracterizados por una amplia gama de condiciones físicas (Denny y Wethey 2001) y, particularmente, en las costas patagónicas están fuertemente estructuradas por el estrés físico (Bertness *et al.* 2006). Los factores físicos más comúnmente estudiados que afectan a los organismos intermareales son la desecación, la salinidad, las altas temperaturas y la exposición a las olas (Levinton 2001). En cuanto a las aguas submareales poco profundas presentan condiciones ambientales más homogéneas que las intermareales, lo que resultaría en un menor estrés físico para la

comunidad que lo habita (Rechimont 2011). Otra diferencia entre estos dos ambientes es que la depredación es mayor en el submareal (Márquez *et al.* 2015); sin embargo, las estructuras de cultivo actúan como refugio de aquellos depredadores que no pueden acceder a los *longlines*. En concordancia con los resultados del PCA realizado sobre toda la muestra, en la variación en forma de la valva relacionada con la AF en la submuestra se observó que la máxima variación de AF en la configuración interna fue sobre la cicatriz del músculo aductor posterior, mientras que en la configuración externa la mayor variación de forma fue respecto a la elongación en la región posterior y la curvatura de la región antero-dorsal. Los resultados muestran que en el hábitat más estresante (intermareal), los valores de AF fueron mayores, lo que sugiere que la presencia de AF en la forma de la valva de mejillón estaría modulada por las diferencias ambientales. Otros estudios en mitílicos informan una relación entre AF y diferentes factores de estrés; por ejemplo, Scalici *et al.* (2017) observaron que los valores de asimetría individual en *M. galloprovincialis* mostraron valores más altos en sitios contaminados. Por otro lado, Lajus *et al.* (2015) encontraron valores más bajos de AF en mejillones de áreas estuariales (menor salinidad) en comparación con los del mar de Barents (con salinidad oceánica). En este sentido, la estrecha asociación entre las condiciones ambientales contrastantes y los niveles de AF podría considerarse como una evidencia de un efecto directo del estrés ambiental en la forma de la valva de los mejillones. Los resultados aquí expuestos reflejan que los mejillones intermareales muestran valores más altos de AF y, de esta manera, aumenta la evidencia de que la AF es una medida confiable de la inestabilidad del desarrollo (Graham *et al.* 1993). Sin embargo, la utilización de la AF como herramienta para medir la inestabilidad del desarrollo varía según el grupo de organismos en el que se estudie y el tipo de exposición a condiciones adversas (Klingenberg 2015; Sandner y Matthies 2017). Según Cardini (2016) la asimetría es probablemente el factor más importante a tener en cuenta para decidir si los datos de digitalización de un solo lado son apropiados o no. Además, el autor sugiere que cuando el tamaño muestral y la configuración de *landmarks* son muy grandes, el digitalizar un solo lado ahorra mucho tiempo de trabajo sin perder precisión ni información. En este

capítulo se encontró que *M. edulis* tiene tanto AF como AD, por lo tanto, se decidió en los capítulos subsiguientes utilizar como variables de forma solo a las derivadas de la digitalización de la valva derecha.

En resumen, la variación en forma del mejillón chubutense es afectada por la alometría, la modularidad y la asimetría fluctuante, que deben tenerse en cuenta a la hora de realizar estudios morfológicos. Además, se describió de forma general e introductoria el morfoespacio del mejillón chubutense. En el siguiente capítulo se estudiarán con mayor detalle las diferencias en la forma de la valva al comparar mejillones procedentes de diferentes localidades (Riacho, Camarones, Comodoro) y procedentes de diferentes hábitats (banco natural, cultivo).

Capítulo 2: Comparación morfológica de las valvas del mejillón del Chubut entre localidades y hábitats

2.1 Introducción

En el 2016 la acuicultura representó el 47% del total de la producción pesquera mundial, traducido en 232.000 millones de dólares de 362.000 millones de dólares de la producción pesquera y acuícola (FAO 2018). Los bivalvos desempeñan un papel clave en las pesquerías y en la acuicultura (Dumbauld *et al.* 2009; Gosling 2003; Kraeuter y Castagna 2001) y son, probablemente, el grupo con mayor importancia económica y ecológica dentro de los moluscos (Newell y Koch 2004). La producción acuícola de bivalvos marinos representó el 49,5% de la producción a nivel mundial en 2016 (FAO 2018).

Los mejillones son un grupo ecológicamente importante que habita un amplio espectro de ambientes, a escala geográfica global el género *Mytilus* es un componente dominante de comunidades costeras rocosas de aguas frías en ambos hemisferios (Gosling 2003). A una escala local, es decir dentro de una misma localidad, los mejillones dominan las regiones intermareales y submareales, y se adaptan tanto a costas rocosas como a distintos tipos de submareales, alterando su comportamiento fisiológico y morfológico (Akester y Martel 2000; Beadman *et al.* 2003; Labarta *et al.* 1997). En particular, *M. edulis* tiene el patrón de distribución más amplio en el género, ya que se lo encuentra tanto en intermareales como submareales, desde zonas con condiciones estuarinas a totalmente marinas, y en costas protegidas sin casi amplitud de marea hasta extremadamente expuestas al oleaje y con grandes amplitudes de mareas (Gosling 2003; Seed y Suchanek 1992).

Los mejillones que habitan en una costa rocosa intermareal están expuestos a una variedad de factores de estrés, como la salinidad, temperatura, disponibilidad de recursos alimenticios, cambio del nivel del mar, precipitación y exposición aérea. Consecuentemente, tanto los factores físicos (Innes y Bates 1999; Kautsky *et al.* 1990; Widdows *et al.* 1984) como biológicos (Caro y Castilla 2004; Norberg y Tedengren 1995; Seed 1968) afectan su distribución a una escala local. Los límites de la distribución superior generalmente se establecen por tolerancia a altas temperaturas y desecación, mientras que los depredadores y la competencia son los principales responsables de establecer los límites

de la distribución inferior (Raffaelli y Hawkins 1996; Seed y Suchanek 1992). La temperatura y la salinidad no solo pueden limitar la distribución espacial de los bivalvos, sino que también afectan los aspectos de su biología como alimentación, reproducción, crecimiento, respiración, osmorregulación e interacciones entre parásitos y enfermedades (Gosling 2003). La exposición a la acción de las olas es otro factor que influye en la distribución y abundancia de los bivalvos en general, siendo distintos órdenes de la familia Mytilidae los únicos grupos epifaunales que vive en las costas expuestas (Gosling 2003). Con el régimen de marea, los mejillones asentados en el intermareal bajo presentan menores tiempos de exposición a condiciones físicas terrestres que los individuos que se encuentran en el intermareal alto, donde los tiempos de emersión son más largos quedando expuestos a temperaturas extremas y a la desecación (Gosling 2003). Aquellos mejillones que habitan zonas submareales, cuentan con otros factores de estrés, como la profundidad del agua, el tipo de sustrato, las corrientes, la turbidez, así como la depredación y la competencia. En los últimos años se realizaron diversos trabajos en donde se asocia a la variabilidad intraespecífica en la morfología de la valva de varias especies de mejillones marinos asociados con distintos factores biológicos, como condiciones tróficas y competencia alimentaria (Alunno-Bruscia *et al.* 2001), fuerza del oleaje (Akester y Martel 2000; Steffani y Branch 2003), tipo de sedimento (Selin 2013), densidad (Briones *et al.* 2014; Guiñez 1996) y la presencia de depredadores (Beadman *et al.* 2003; Caro y Castilla 2004). Todos estos factores desencadenan cambios en los rasgos fenotípicos y la comprensión de esta relación ha sido el principal objetivo de los ecólogos evolutivos (Piersma y Van Gils 2011).

Frecuentemente se asume que las diferencias morfométricas reflejan la divergencia genética en respuesta a las presiones de selección local, pero a veces resultan ser plenamente inducidas por el ambiente (Swain y Foote 1999). La plasticidad fenotípica refiere a un mismo genotipo que se expresa de modo diferencial generando distintos fenotipos en diferentes ambientes (Turcotte y Levine 2016) y es reconocida actualmente como un importante mecanismo evolutivo (DeWitt *et al.* 1998; Pigliucci 2001). Cuando una población local está adaptada a un ambiente particular y muestra diferencias genéticas con

otras poblaciones como consecuencia de esa adaptación (MacLean y Evans 1981) se la conoce como *stock*. Aunque las diferencias genéticas entre las poblaciones son una condición de esta definición, la identificación de poblaciones a menudo estuvo basada en caracteres morfológicos en lugar de medidas directas de diferenciación genética (Swain y Foote 1999). Esto ha llevado a la determinación de "*stocks* fenotípicos", caracterizados por diferencias fenotípicas que pueden ser totalmente inducidas por el ambiente; son grupos de individuos con crecimiento, mortalidad y tasas reproductivas similares (Ihssen *et al.* 1981; Waldman 2005), que se desarrollan en áreas geográficas específicas. Un componente aplicado del uso de la morfometría geométrica (MG) puede encontrarse en su utilización para la identificación de estos *stocks* fenotípicos (Cadrin y Friedland 1999; Márquez *et al.* 2018; Márquez *et al.* 2010).

La diversidad morfológica es entendida como el producto final de la influencia dada por la genética, el desarrollo y el ambiente, y su cuantificación es la medida más intuitiva de la variación biológica (Willmore *et al.* 2007). Bajo este marco teórico se propone que en la evaluación de los *stocks* pesqueros, las poblaciones morfológicamente distintas deben modelarse y administrarse como unidades de manejo separadas (Cadrin y Friedland 1999; Cadrin *et al.* 2014; Cadrin 2000). Este tipo de información es necesaria para la gestión correcta de las pesquerías, para lograr una producción sostenible, reconstruir *stocks* que han sido sobreexplotados, así como para la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción (Cadrin 2000).

Históricamente se han utilizado las características de las valvas de los bivalvos para identificar a las diferentes especies (Bieler *et al.* 2013). Las valvas y sus estructuras asociadas, como los músculos (Norberg y Tedengren 1995) y los filamentos bisales (Moeser y Carrington 2006) son las que presentan mayor variabilidad ante diferentes condiciones ambientales (Beadman *et al.* 2003; Seed 1968). Dado que las valvas de los mejillones están en contacto permanente con el medio ambiente y conservan las improntas de las principales características anatómicas blandas, son estructuras candidatas para estudios morfométricos. Existen varios ejemplos de este tipo de estudios, donde se utiliza la forma

de la valva para diferenciar entre especies que tienen forma similar (Costa *et al.* 2008; Ferson *et al.* 1985; Innes y Bates 1999; Rufino *et al.* 2006; Van der Molen *et al.* 2013) o para analizar la variación intraespecífica a lo largo de un amplio gradiente geográfico (Krapivka *et al.* 2007; Márquez *et al.* 2018; Márquez y Van Der Molen 2011; Palmer *et al.* 2004), o entre los mejillones de cultivos (o submareal) y los de intermareal (Beadman *et al.* 2003; Kirk *et al.* 2007; Savoya 2011; Valladares *et al.* 2010). Por lo tanto, conocer la variabilidad en la forma de la valva de los mejillones en particular, desempeña un papel importante en muchos campos de la ciencia, como en la taxonomía, filogenética, evolución, ecología de la bioinvasión y acuicultura (Gardner y Thompson 2009; Gardner 1995; Illesca *et al.* 2018; McDonald *et al.* 1991; Seed y Suchanek 1992; Toro 1998).

El aumento del consumo y la comercialización de productos pesqueros en los últimos decenios ha ido acompañado de un creciente interés por la calidad y la inocuidad de los alimentos, los aspectos nutricionales y la reducción de los desperdicios (FAO 2018). Desde un punto de vista productivo y/o comercial, diferenciar a los mejillones según su hábitat sea banco natural o de cultivo, así como también reconocerlos según su área geográfica es de gran importancia para lograr el correcto etiquetado del producto, para proteger los derechos de los consumidores de conocer que están consumiendo, así como también para lograr la trazabilidad de los alimentos y cumplir otros objetivos de calidad, como la denominación de origen (Larraín *et al.* 2012). En los mejillones, el primer nivel de trazabilidad se cumple actualmente mediante métodos de identificación genética de especies, empleados para investigar el fraude comercial mediante la sustitución de especies (Fernández-Tajes *et al.* 2011; Santaclara *et al.* 2006). El segundo nivel de trazabilidad de los mejillones es el origen geográfico, el cual no puede establecerse simplemente identificando la especie, debido a la distribución mundial de *Mytilus* (Gérard *et al.* 2008; Westfall y Gardner 2013; Wonham 2004); por lo tanto, determinar el origen geográfico de la muestra equivale a identificar su población biológica (Ogden 2008). Los antecedentes mencionados impulsan a evaluar y caracterizar las variaciones de la forma de los mejillones de distintas zonas de producción, haciendo énfasis en la diferenciación entre *stocks* cultivados y

naturales. Esta información permite plantear posibles medidas de control pesquero para determinar la procedencia de las capturas y/o diferenciar entre individuos cosechados de los bancos naturales o cultivados y así conocer la trazabilidad del producto comercial.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue comparar la variación morfológica de la valva de mejillones entre sitios, entre localidades dentro de cada hábitat, y dentro de cada localidad entre hábitats. A su vez, se estudió la relación entre las variables ambientales de cada localidad y las variables de forma de las valvas. Así este capítulo intenta proponer a la morfometría geométrica como herramienta para la fácil identificación del origen del mejillón y su implementación para desarrollar la denominación de origen, o marca registrada con un fin productivo.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Descripción de los sitios de muestreo

Se realizaron muestreos en tres localidades de la provincia de Chubut, abarcando toda la costa desde -42° (Riacho San José) hasta -45° (Playa Belvedere, Comodoro Rivadavia). En las costas patagónicas, el mejillón *M. edulis* predomina en el ecosistema intermareal, ambiente expuesto a condiciones físicas extremas debido a los vientos secos del sur presentes durante todo el año, a la baja precipitación y la baja humedad (Bertness *et al.* 2006). A su vez, el estrés físico en la costa chubutense difiere entre áreas expuestas al oleaje y caletas o bahías protegidas de la fuerza de las olas: en estas últimas la desecación es mucho mayor (Bertness *et al.* 2006). La ubicación geográfica de los sitios de muestreo se muestra en la figura IV de la sección Metodología General. Las tres localidades están dentro de un rango latitudinal que abarca aproximadamente 480 km en línea recta entre las localidades más distantes y se diferencian entre sí por su geografía, amplitud de marea, intensidad del oleaje y viento, entre otras variables ambientales.

* Riacho (Ri): Dentro del Área Natural Protegida Península Valdés, en el Golfo San José la circulación de las mareas genera dominios con características oceanográficas contrastantes: Dominio Este y Dominio Oeste (Amoroso y Gagliardini 2010). El Riacho está

situado en el ángulo sudoeste de este golfo, en el dominio oeste, donde predominan los vientos del oeste durante el otoño y el invierno (Hernández-Moresino *et al.* 2019). El régimen de mareas es semidiurno, con una amplitud de marea máxima de 8,85 metros (www.hidro.gob.ar 2019), los únicos días en los cuales se puede acceder al banco de mejillones es durante las mareas extraordinarias (figura 2.1a). La zona está conformada por un humedal donde el sustrato está constituido por arenas finas, limo y rodados, así se configura un fondo blando móvil que conforma extensos bancos (figura 2.1b). Dada las características de su costa, en Riacho se utilizan camas de cultivo (RiCC) de red separadas del banco natural (RiBN) por una altura de 30 cm aproximadamente ubicadas en el intermareal, la función principal de estas estructuras es el engorde del mejillón (figura 2.1c). Al momento de la recolección de las muestras, el cultivo en camas estaba prácticamente abandonado (debido a problemas de logística) por lo que el número de ejemplares fue bajo (figura 2.1d).



Figura 2.1 Muestro en Riacho. a) pescadores artesanales durante la faena de pesca, b) cuadrante en el banco natural, c) vista general de una de las camas de cultivo, d) detalle de los mejillones en las camas de cultivo.

* Camarones (Ca): El banco natural de Camarones (CaBN) se encuentra ubicado en una caleta (Caleta Carolina) al resguardo del embate de las olas y con una amplitud promedio de las mareas a lo largo de la costa de 4 m. (Bertness *et al.* 2006) (figura 2.2a). Dentro de la Caleta Carolina se ubica el cultivo en *longline* de la escuela n° 721 (CaCE) y en la entrada de la misma el cultivo en *longline* de Stephane Sorroche (CaCS) (figura 2.2b). En época de verano esta caleta es muy frecuentada por turistas y/o lugareños y es fácil acceder al banco natural de mejillones durante la marea baja (figura 2.2c). El intermareal donde se asientan los mejillones es de roca basáltica (figura 2.2d). (Bertness *et al.* 2006).



Figura 2.2 Muestreo en Camarones. a) Se señala con una elipse las boyas que marcan el cultivo de la escuela (CaCE), b) línea de cultivo de Stephane Sorroche (CaCS) con doble red, c) y d) vista general del banco natural.

* Comodoro (Co): La zona de Playa Belvedere se encuentra al sur de Rada Tilly, en mar abierto y por ello el banco natural (CoBN) está potencialmente expuesto al fuerte oleaje y, además, con una amplitud de marea máxima de 6.10 metros (www.hidro.gob.ar 2019) (figura 2.3a). Al igual que el de Camarones, es de fácil acceso y muy frecuentado por turistas y/o lugareños en los meses de verano. El terreno es rocoso sin ser basáltico y el banco de mejillones se encuentra principalmente sobre un banco de *Perumytilus purpuratus* (figura 2.3b). Los dos cultivos muestreados están distanciados 25 km uno del otro. El cultivo de la

escuela de biología marina n° 704 (CoCE) se encuentra enfrente al colegio, en el kilómetro n° 3 de la ciudad de Comodoro Rivadavia (figura 2.3c), mientras que el cultivo de la ACC (CoCM) se encuentra dentro del Parque de Maricultura Playa Belvedere. Cabe destacar que el cultivo de la escuela de Comodoro (CoCE) estaba casi abandonado el año de muestreo por dificultades logísticas del colegio para lograr el mantenimiento adecuado (figura 2.3d).



Figura 2.3 Muestreo en Comodoro. a) Vista general del banco natural, b) cuadrante sobre el banco de mejillón donde se observa por debajo un banco de *Perumytilus purpuratus*, c) Cultivo de la Escuela (CoCE; foto Renato Frias), d) Línea de cultivo en el laboratorio de la escuela (foto Claudia Cano).

2.2.2 Análisis estadísticos

- *Sobre la forma.* La obtención de las imágenes en las cuales se basa este análisis se detalla en el capítulo de Metodología General. En el capítulo 1 también se demostró la presencia

de alometría y de dos módulos (interno y externo) y la ausencia de dimorfismo sexual en la forma de la valva. Con el fin de evaluar el grado de diferenciación entre todos los sitios de muestreo y conocer los componentes de la forma que maximizan su separación, sobre cada módulo por separado, se realizó un análisis de variables canónicas (CVA, por sus siglas en inglés) (Manly 1986). A su vez, las diferencias en la forma de la valva entre cada sitio fue analizada mediante una extensión para el caso multivariado del método de comparaciones múltiples basado en un análisis de conglomerados (Márquez *et al.* 2010; Márquez y Van Der Molen 2011; Valdano y Di Rienzo 2007), calculado mediante el método de agrupamiento jerárquico de encadenamiento promedio (o UPGMA por sus siglas en inglés) en el *software* InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012) construido a partir de las distancias de Mahalanobis. Este método es útil para determinar, utilizando la estadística inferencial, el número de grupos en un análisis de conglomerados jerárquico (Valdano y Di Rienzo 2007). Luego, mediante un análisis de variables canónicas dentro de cada hábitat por separado (banco natural o cultivo) se buscaron los componentes de forma que maximizaran la separación entre las localidades.

Por otro lado, dentro de cada localidad, se determinaron los componentes de forma que maximizan las diferencias entre los hábitats (entre el banco natural y el cultivo) mediante un análisis discriminante, y se puso a prueba la diferencia de medias entre estos mediante una prueba permutacional de T^2 de Hotteling con 10.000 repeticiones. Se evaluó también la tasa de error aparente (estimadores de la probabilidad de una mala clasificación) como porcentaje de error para cada grupo, mediante una tabla de clasificación cruzada en el *software* InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012). Si bien las tasas de error aparente tienden a subestimar el error, son útiles cuando se disponen de grandes tamaños muestrales de cada población (Johnson y Wichern 1998).

- *Sobre las variables ambientales y su relación con la forma.* Para caracterizar a cada localidad, se obtuvieron distintas estimaciones de variables ambientales de manera remota con una base de datos de imágenes satelitales de resolución espacial de 4 km². Se utilizó la página de internet de libre acceso *Goddard Earth Sciences Data* (GES) de la NASA y el Centro

de Servicios de Información (DISC) (www.giovanni.gsfc.nasa.gov/giovanni/ 2019) en la cual se consultaron las siguientes variables físicas: temperatura atmosférica (utilizando AIRX3STM), velocidad del viento (MERRA 2model) e irradiancia, para caracterizar el intermareal, y la temperatura superficial del mar (SST; ModisAqua), salinidad (Aquarius/SAC-D) y clorofila (ModisAqua) para el submareal. A su vez, para observar de manera gráfica la relación entre las variables ambientales y las localidades, para cada hábitat se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), utilizando a las variables ambientales como variables respuesta y a las localidades como criterio de clasificación. Debido a que las localidades muestreadas fueron tres, no se pudo calcular un análisis estadístico robusto que ponga a prueba la asociación entre la forma de la valva y las variables ambientales. Dado que el agrupamiento de objetos multivariados es frecuentemente utilizado como método exploratorio de datos con la finalidad de obtener mayor conocimiento sobre la estructura de las observaciones y/o variables en estudio (Balzarini *et al.* 2008), se realizó un análisis de conglomerados para las variables de forma (utilizando distancia de Mahalanobis) para ambos módulos por separado, y otro para las variables ambientales (utilizando distancia Euclidea). Esto se realizó con el objeto de observar si las variables de forma y las ambientales siguen un mismo patrón de agrupamiento. Los conglomerados se hicieron por separado según si se tratara de intermareales (variables ambientales: temperatura atmosférica, velocidad del viento e irradiancia) o submareales (variables ambientales: SST, salinidad y clorofila).

2.3 Resultados

2.3.1 Sobre la forma

Los resultados se presentan para cada módulo (interno y externo) por separado.

El análisis de variables canónicas (CVA) indicó que los dos primeros ejes explican el 69,03% (módulo externo) y el 83,35% (módulo interno) de la variación total de la forma de la valva del mejillón que maximiza la separación entre todos los sitios de muestreo. Como se detalla en la figura 2.4, análisis realizado sobre el módulo externo, el primer eje de variación (CV1: 40,51%) está asociado a la diferenciación entre hábitats (banco natural o de cultivo). Los individuos del banco natural presentaron valvas más delgadas con un desplazamiento del umbo hacia la zona ventral y una retracción en la zona posterior (valores positivos), mientras que en los cultivos se hallaron las valvas más globosas, con un retraimiento del umbo y una expansión posterior (valores negativos). El CV2, que explica el 28,52%, estuvo asociado a la diferencias entre localidades: Camarones (CaBN, CaCS, CaCE) en los valores positivos, mostrando una expansión en la zona del ligamento y una restricción en la zona ventral, en los valores medios Riacho (RiCC y RiBN) y sobre los valores negativos Comodoro (CoBN, CoCM, CoCE), estos últimos representados por valvas con una expansión en la zona ventral y una leve restricción en la zona dorsal anterior.

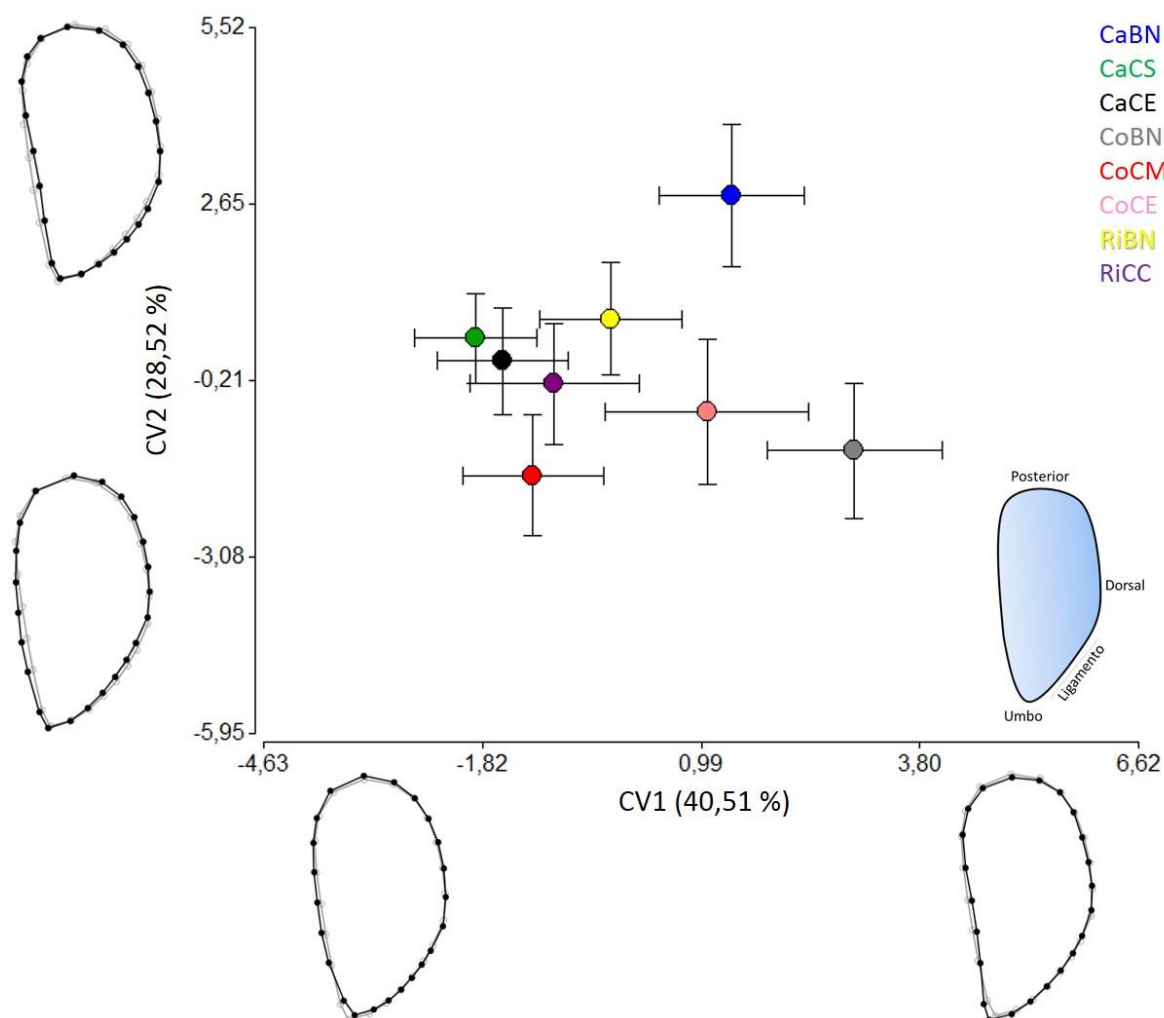


Figura 2.4 Gráfico de dispersión de los dos primeros ejes canónicos (CV), para el **módulo externo** de la valva del mejillón *M. edulis*, que maximizan la separación entre los sitios de muestreo. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de varianza que explica cada eje. Las siluetas o *wireframes* indican los extremos del cambio en la forma de la configuración externa (en negro la forma objetivo y en gris el consenso) a lo largo de cada eje de variación, con un factor de escala de ± 4 y ± 3 para el CV1 y CV2 respectivamente. CaBN: Camarones Banco Natural, CaCS: Camarones Cultivo Stephane Sorroche, CoBN: Comodoro Banco Natural, CoCM: Comodoro Cultivo ACC, CaCE: Camarones Cultivo Escuela n° 721, CoCE: Comodoro Cultivo Escuela n° 704, RiBN: Riacho Banco Natural, RiCC: Riacho Cultivo en Camas.

En el conglomerado del módulo externo (figura 2.5) se observa que cada sitio presentó una forma significativamente distinta de las demás ($P < 0,05$), con una tendencia a agruparse según hábitat, a excepción del banco natural de Riacho (RiBN). Los grupos que presentaron distancias menores fueron los dos cultivos de Camarones (CaCE y CaCS) mientras que el banco natural de Comodoro (CoBN) fue el más divergente en cuanto a la forma externa de la valva.

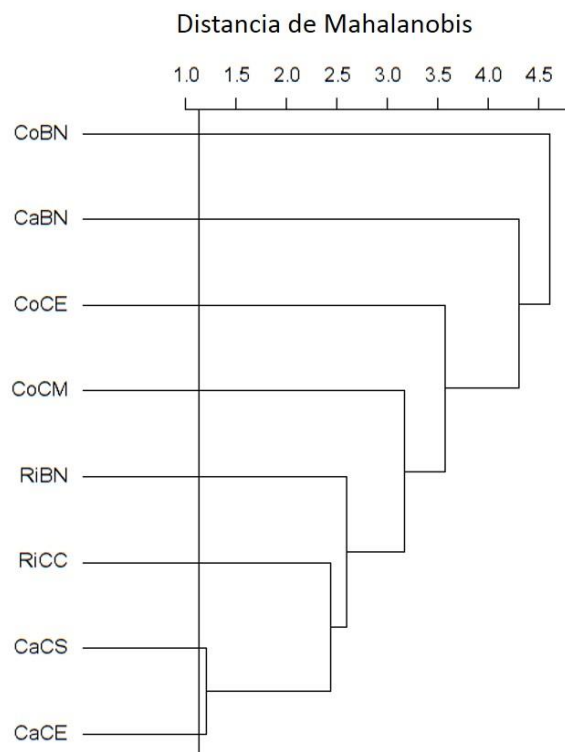


Figura 2.5 Conglomerado Jerárquico UPGMA sobre las distancias de Mahalanobis, que ilustra las relaciones entre la forma media del **módulo externo** de los diferentes sitios. La línea vertical corresponde al criterio de corte ($P < 0,05$) obtenido a partir de la prueba MDGC, la cual determina la presencia de grupos estadísticamente distintos. CaBN: Camarones Banco Natural, CaCS: Camarones Cultivo Stephane Sorroche, CoBN: Comodoro Banco Natural, CoCM: Comodoro Cultivo ACC, CaCE: Camarones Cultivo Escuela n° 721, CoCE: Comodoro Cultivo Escuela n° 704, RiBN: Riacho Banco Natural, RiCC: Riacho Cultivo en Camas.

El análisis de variables canónicas para el módulo interno (figura 2.6), muestra que el CV1 explica el 60,80%; hacia los valores negativos se encuentran ubicados los sitios pertenecientes a Comodoro y hacia los valores positivos los sitios de Camarones y Riacho. La variación en forma hacia los valores negativos del eje muestra un músculo aductor más desarrollado con una restricción postero-dorsal en el músculo retractor del pie y un leve desplazamiento antero-ventral del músculo aductor posterior; se observa el patrón de variación contrario hacia los valores positivos.

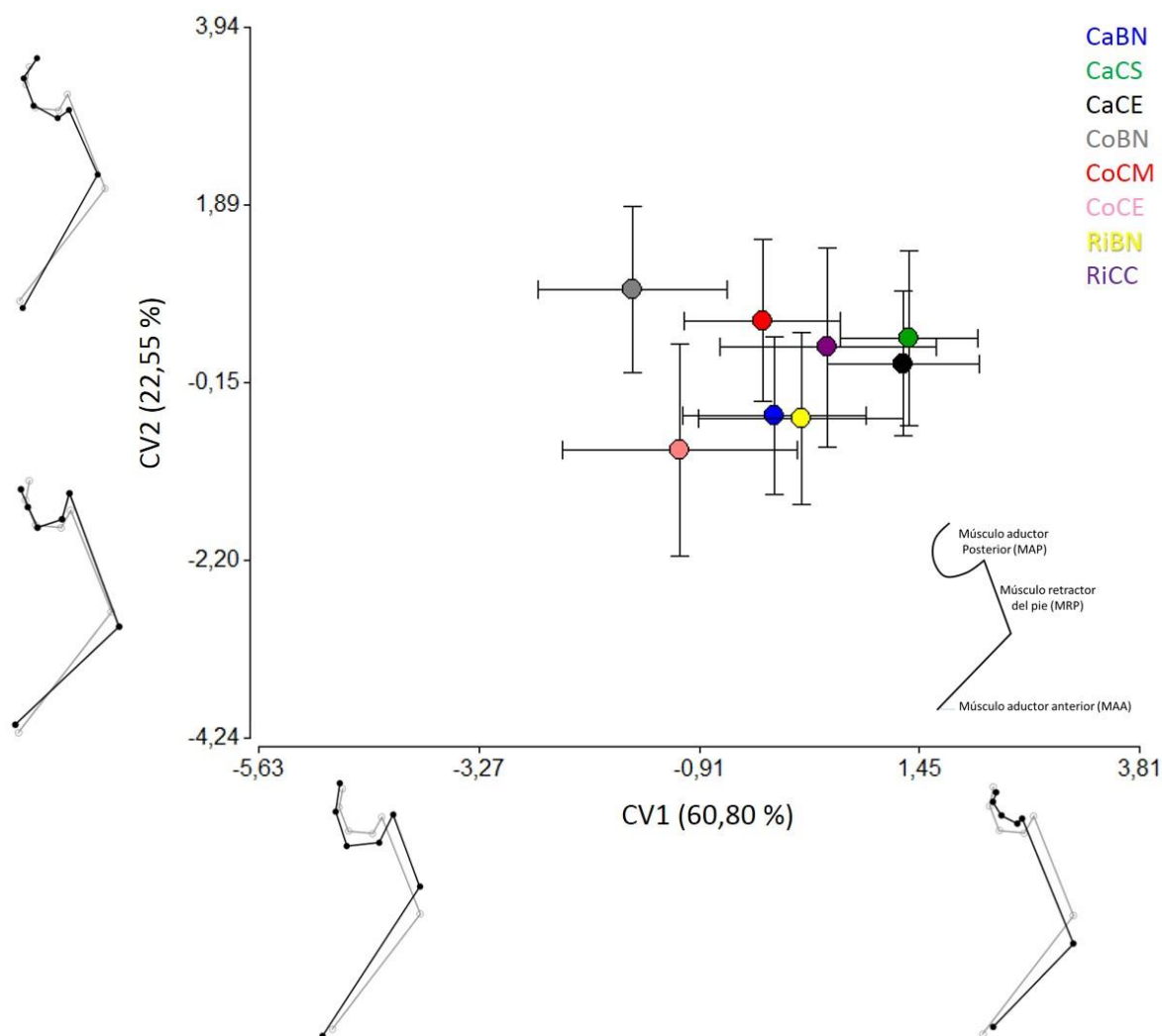


Figura 2.6 Gráfico de dispersión de los dos primeros ejes canónicos (CV) para el **módulo interno** de la valva del mejillón *M. edulis* que maximizan la separación entre los sitios de muestreo. Entre paréntesis se presentan los porcentajes de varianza que explica cada eje. Las siluetas o *wireframes* indican los extremos del cambio en la forma de la configuración interna (en negro la forma objetivo y en gris el consenso) a lo largo de cada eje de variación, con un factor de escala de ± 3 y ± 2 para el CV1 y CV2 respectivamente. CaBN: Camarones Banco Natural, CaCS: Camarones Cultivo Stephane Sorroche, CoBN: Comodoro Banco Natural, CoCM: Comodoro Cultivo ACC, CaCE: Camarones Cultivo Escuela n° 721, CoCE: Comodoro Cultivo Escuela n° 704, RiBN: Riacho Banco Natural, RiCC: Riacho Cultivo en Camas.

El CV2 por su parte no presenta un patrón claro en cuanto a las localidades o tipo de hábitats: en los valores negativos se encuentra un músculo aductor posterior más compacto, una expansión antero-dorsal del músculo retractor del pie y un leve desplazamiento ventral del músculo aductor posterior. Mientras que, los módulos internos hacia los valores positivos exhiben un músculo aductor más desarrollado. Respecto del

conglomerado sobre las distancias de Mahalanobis del módulo interno (figura 2.7), a excepción de los cultivos de Camarones, cada grupo presenta una forma media característica, significativamente distinta a las demás ($P < 0,05$). A distancias superiores a 1,20 se distinguen tres grupos: el grupo con la menor distancia lo constituyen los dos cultivos de Camarones (CaCE / CaCS) y el cultivo de Riacho (RiCC). El segundo grupo menos distante está conformado por los bancos naturales de Riacho y Camarones (RiBN y CaBN respectivamente) junto con el cultivo de la ACC (CoCM). El grupo más distante es a aquel formado por el cultivo de la escuela de Comodoro (CoCE) y el banco natural de la misma localidad (CoBN).

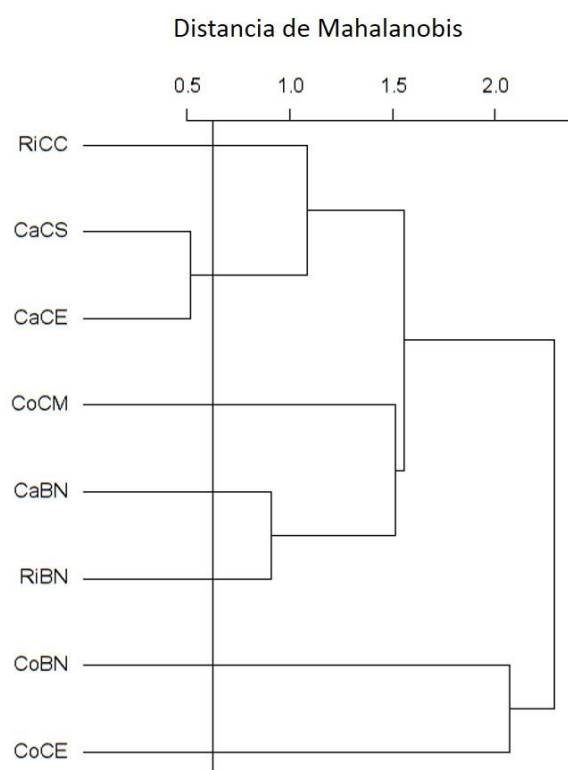


Figura 2.7 Conglomerado Jerárquico UPGMA sobre las distancias de Mahalanobis, que ilustra las relaciones entre la forma media del **módulo interno** de los diferentes sitios. La línea vertical corresponde al criterio de corte ($P < 0,05$) obtenido a partir de la prueba MDGC, la cual determina la presencia de grupos estadísticamente distintos.

Con el fin de entender los componentes de forma que maximizan la separación entre las distintas localidades dentro de cada hábitat (cultivos y bancos naturales), se detallan a continuación los resultados de los CVA. Dentro de los bancos naturales (intermareales), en

el CV1 (73,68%) del módulo externo se observa que Riacho y Comodoro (valores positivos) presentan mayores similitudes entre sí que respecto a Camarones (valores negativos) (figura 2.8). La forma externa en los valores negativos muestra un retraimiento en la zona ventral y un acortamiento en el umbo, mientras que hacia los valores positivos la variación es la opuesta. Por otro lado, en el CV2 (26,31%) las formas medias de las localidades se separaron en coincidencia con el gradiente latitudinal: en Riacho (norte de Chubut) se observan contornos más globosos (valores negativos) y en el extremo positivo contornos más rectangulares correspondientes a Comodoro (sur del Chubut). Camarones se encuentra en un valor intermedio.

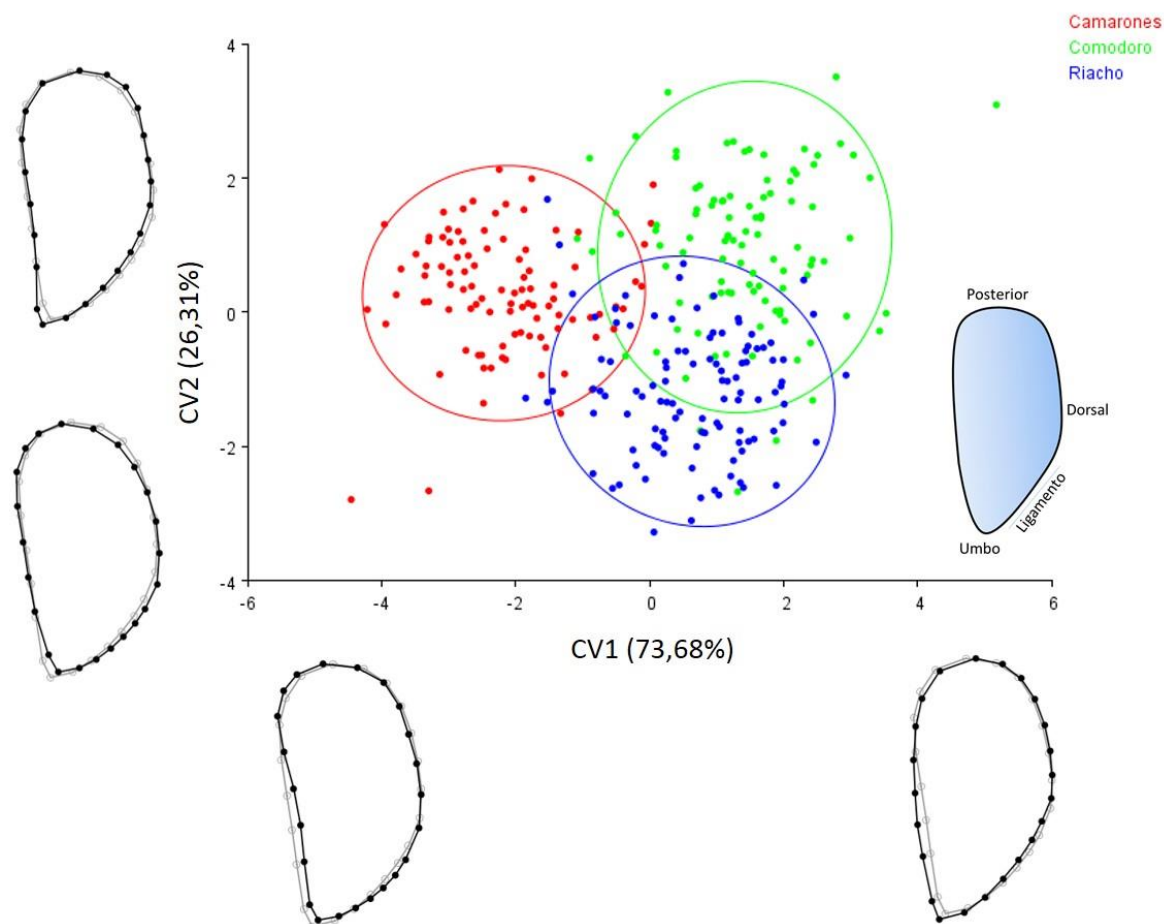


Figura 2.8 Gráfico de dispersión de los dos primeros ejes canónicos (CV) para el **módulo externo** de la valva del mejillón *M. edulis* que maximizan la separación entre las localidades, dentro de los bancos naturales. Las elipses representan un intervalo de confianza del 90%. Entre paréntesis se presentan los porcentajes de varianza que explica cada eje. Las siluetas o *wireframes* indican los extremos del cambio en la forma de la configuración externa (en negro la forma objetivo y en gris el consenso) a lo largo de cada eje de variación, con un factor de escala de ± 5 y ± 4 para el CV1 y CV2 respectivamente.

El análisis del módulo externo de los organismos provenientes de cultivos de las distintas localidades muestra que el eje de variación 1 (CV1: 74,41%; figura 2.9), separó a Comodoro con valvas con una expansión en la zona del ligamento y una retracción en la línea ventral y el área del umbo (valores negativos), mientras que hacia los valores positivos se encuentra la localidad de Camarones con el cambio de forma opuesto. En los valores intermedios se ubica el Riacho que en el CV2 (25,58%; figura 2.10) se desplaza a los valores positivos separándose de Camarones y Comodoro. Las variaciones en forma de los valores positivos del CV2 están asociadas a un retraimiento en la línea ventral, con una expansión posterior.

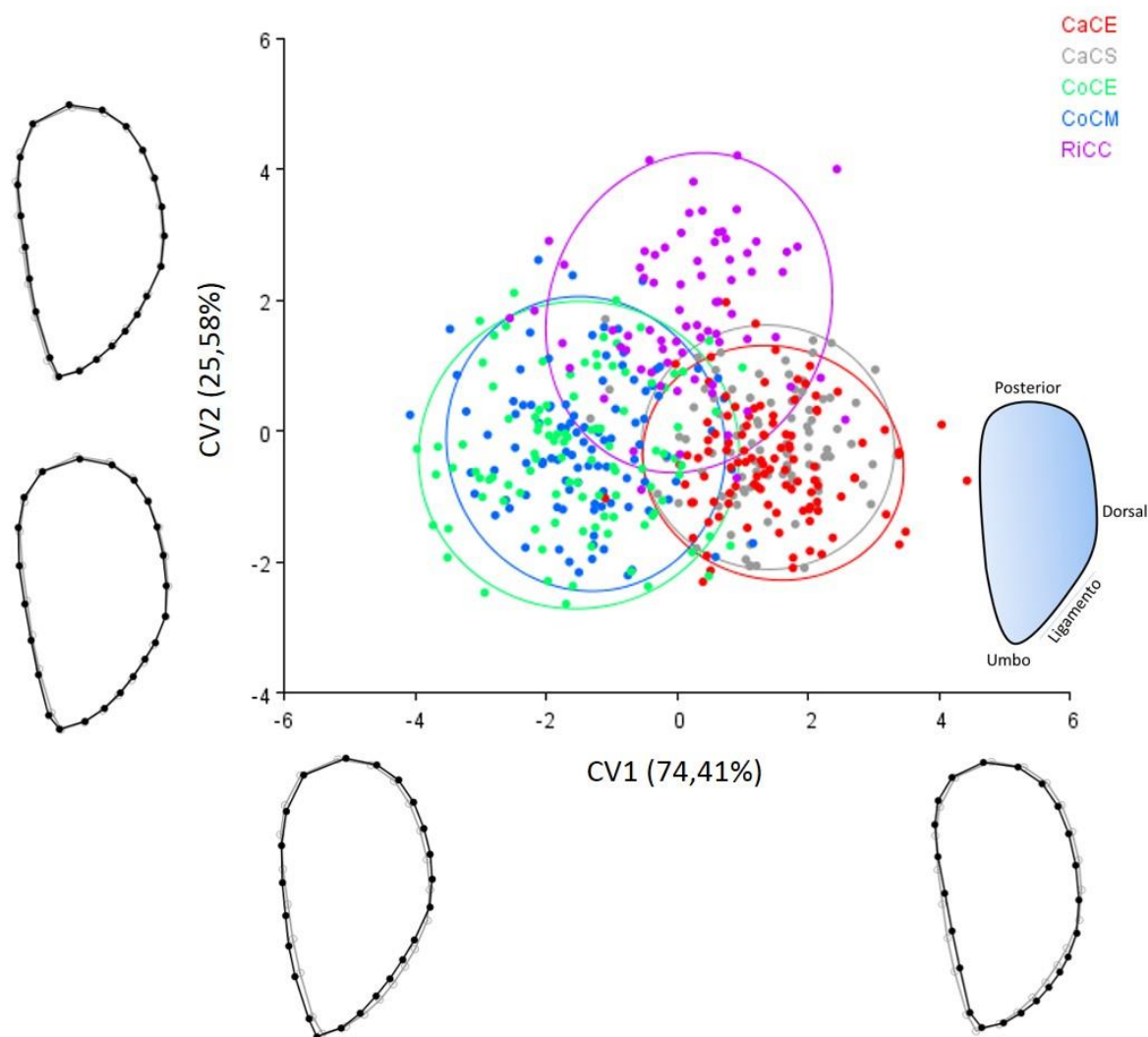


Figura 2.9 Gráfico de dispersión de los dos primeros ejes canónicos (CV) para el **módulo externo** de la valva del mejillón *M. edulis* que maximizan la separación entre las localidades, dentro de los cultivos. Las elipses representan un intervalo de confianza del 90%. Entre paréntesis se presentan los porcentajes de varianza que presenta cada eje. Las siluetas o *wireframes* indican los extremos del cambio en la forma de la configuración externa (en negro la forma objetivo y en gris el consenso) a lo largo de cada eje de variación, con un factor de escala de ± 6 y ± 4 para el CV1 y CV2 respectivamente. CaCE: Camarones Cultivo Escuela n° 721, CaCS: Camarones Cultivo S. Sorroche, CoCE: Comodoro Cultivo Escuela n° 704, CoCM: Comodoro Cultivo ACC.

El análisis de la configuración interna, dentro de los bancos naturales (figura 2.10) muestra que el CV1 explica el 81,11% de la variación en la forma que maximiza la separación entre las localidades. Hacia los valores negativos se ubicaron la mayoría de los ejemplares pertenecientes a las localidades de Camarones y Riacho, mientras que los de Comodoro se encuentran desplazados hacia los valores positivos. La forma de la valva en los valores

negativos se asocia a un menor desarrollo del músculo aductor posterior con un desplazamiento antero-dorsal del músculo retractor del pie y una leve retracción posterior del músculo aductor anterior; mientras que el patrón de variación encontrado en los valores positivos es el contrario. El CV2 explica el 18,90% de la variación en forma, donde algunos individuos de Riacho se desplazan hacia los valores más positivos. Este lugar del morfoespacio está representado principalmente por formas con una leve expansión dorsal del músculo retractor del pie. Los cambios en forma contrarios se observan hacia los valores negativos.

Al comparar la forma del módulo interno de los cultivos, los valores negativos del CV1 (93,10%) están definidos por una expansión anterior del músculo aductor posterior, con un acortamiento posterior del músculo retractor del pie y un leve desplazamiento anterior del músculo aductor anterior. En general el gradiente de valores negativos a positivos del eje estuvo definido por los dos cultivos de Comodoro, luego Riacho y en los valores positivos los cultivos de Camarones (figura 2.11). El CV2 explica el 6,90% de la variación y existe un solapamiento entre los distintos cultivos, donde en los valores positivos los ejemplares presentan el músculo aductor posterior con una expansión dorsal. Para observar de manera conjunta la variación en forma para el módulo interno y externo, se muestran en la figura 2.12 las siluetas o *wireframe* para los valores negativos y positivos de los dos primeros ejes canónicos dentro de los bancos naturales (figura 2.12a) y dentro de los cultivos (figura 2.12b).

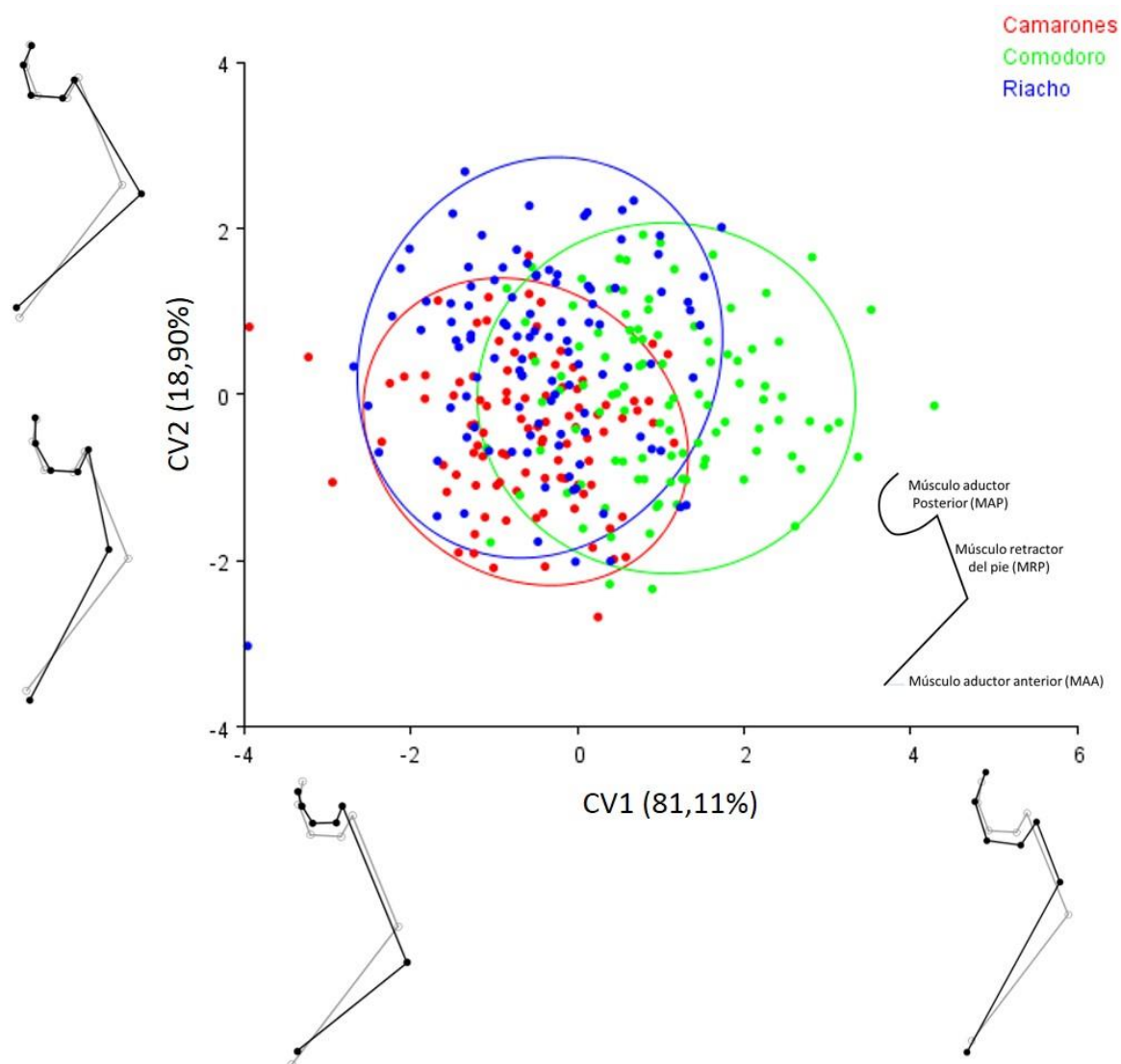


Figura 2.10 Gráfico de dispersión de los dos primeros ejes canónicos (CV) para el **módulo interno** de la valva del mejillón *M. edulis* que maximizan la separación entre las localidades, dentro de los bancos naturales. Las elipses representan un intervalo de confianza del 90%. Entre paréntesis se presentan los porcentajes de varianza que presenta cada eje. Las siluetas o *wireframes* indican los extremos del cambio en la forma de la configuración externa (en negro la forma objetivo y en gris el consenso) a lo largo de cada eje de variación, con un factor de escala de ± 6 y ± 4 para el CV1 y CV2 respectivamente.

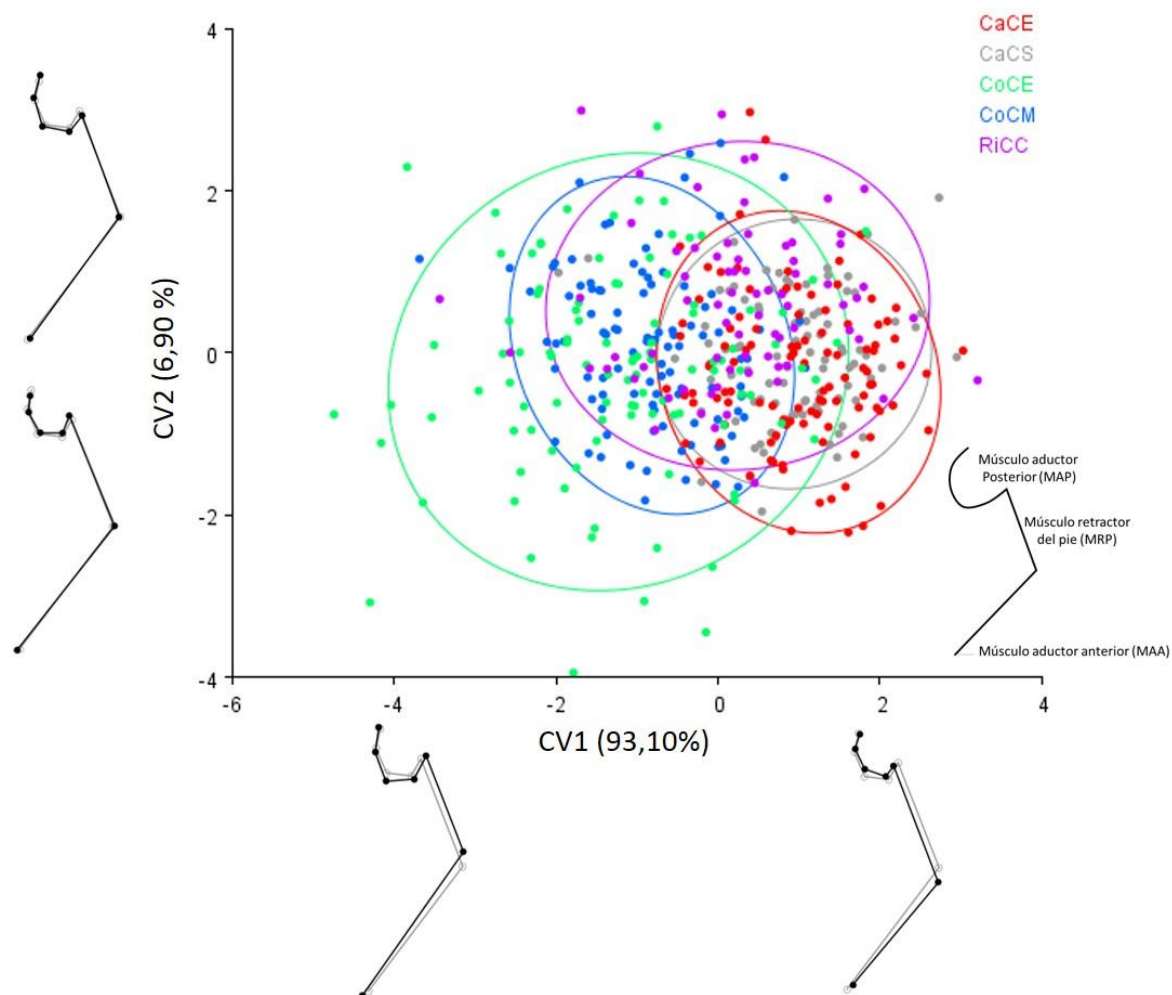


Figura 2.11 Gráfico de dispersión de los dos primeros ejes canónicos (CV) para el **módulo interno** de la valva del mejillón *M. edulis* que maximizan la separación entre las localidades, dentro de los cultivos. Las elipses representan un intervalo de confianza del 90%. Entre paréntesis se presentan los porcentajes de varianza que presenta cada eje. Las siluetas o *wireframes* indican los extremos del cambio en la forma de la configuración externa (en negro la forma objetivo y en gris el consenso) a lo largo de cada eje de variación, con un factor de escala de ± 3 y ± 2 para el CV1 y CV2 respectivamente.

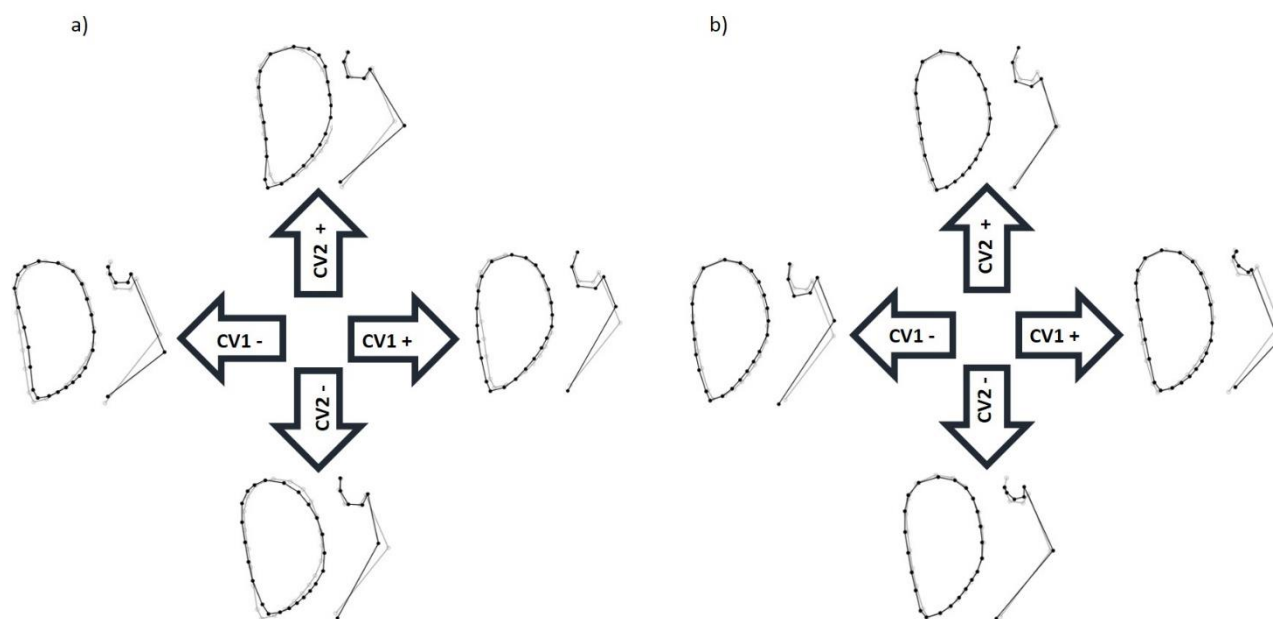


Figura 2.12 Siluetas o *wireframe* extraídos de los análisis discriminantes canónicos, que indican los extremos del cambio en la forma de las dos configuraciones, la interna y la externa, a lo largo de los dos primeros ejes de máxima separación entre los grupos. En negro la forma objetivo y en gris el consenso, con un factor de escala exagerado de ± 6 para visualizar mejor las diferencias en forma. a) Dentro de los bancos naturales, y b) dentro de los cultivos.

Mediante un análisis discriminante se evaluaron los componentes de forma (internos y externos) que maximizan la separación entre los mejillones de los distintos hábitats dentro de cada localidad. En las tres localidades se observa que los cultivos generalmente presentan mejillones de valvas más globosas con una expansión ventral y dorsal, en comparación con los bancos naturales que presentan valvas más aguzadas (figura 2.13); para todas las comparaciones se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). En la tabla 2.1 se describen las principales variaciones en la forma de la valva para cada sitio de las tres localidades, tanto para el módulo externo como para el módulo interno. Cabe destacar que en Camarones no se encontraron diferencias entre los dos cultivos ($P = 0,133$) y que en Comodoro la diferencia en el contorno externo entre los dos cultivos (CoCE y CoCM) son sutiles: el grupo CoCM muestra una expansión en la parte posterior y ventral. El módulo interno entre los grupos de Comodoro difiere ($P < 0,001$) sutilmente y la mayor diferencia se encuentra entre el banco natural (CoBN) y el cultivo de

la escuela (CoCE), con el músculo aductor más desarrollado y un músculo retractor del pie desplazado posteriormente en el primer caso.

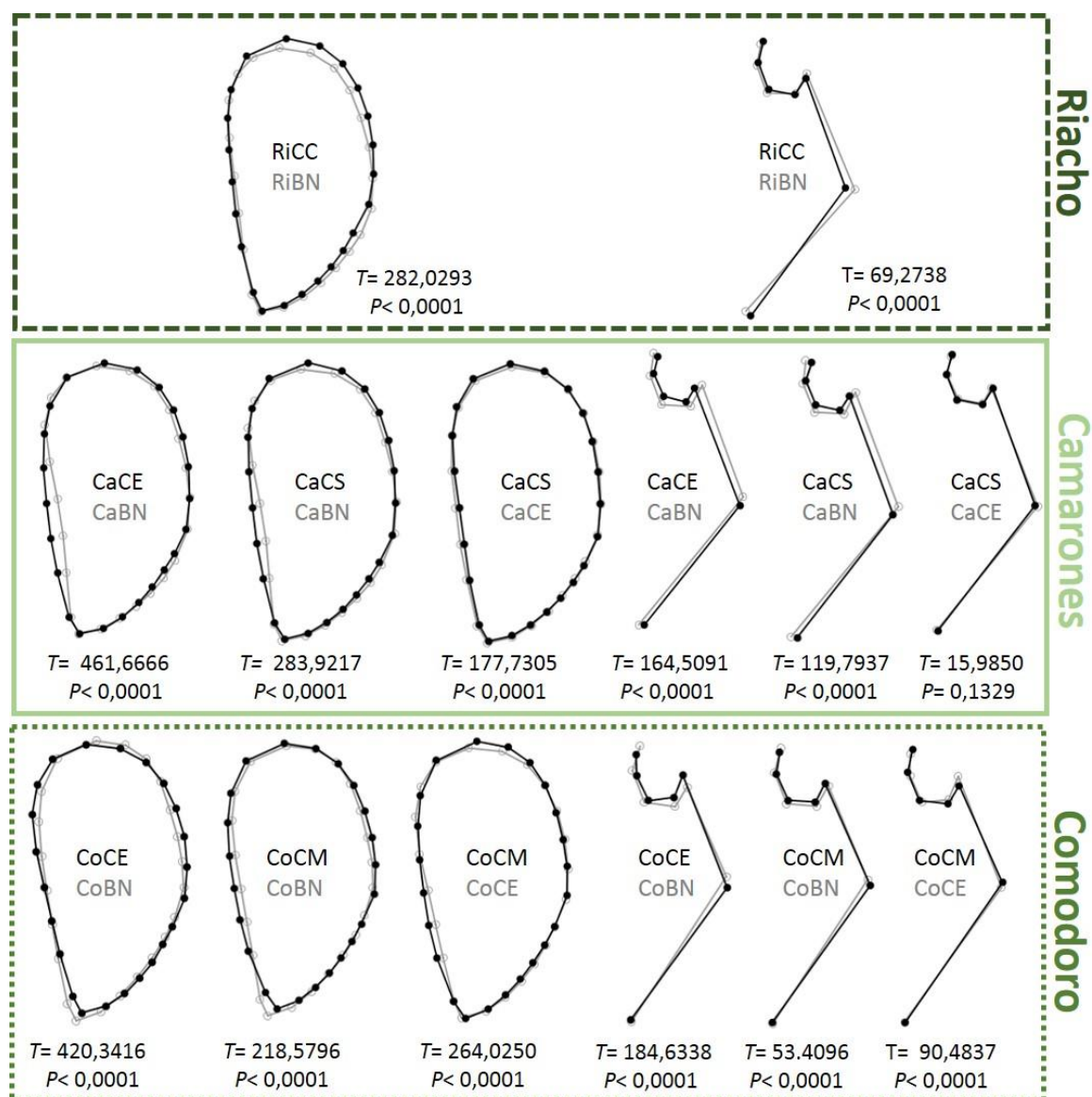


Figura 2.13 Siluetas o *wireframes* obtenidas del análisis discriminante realizado en cada localidad (factor de escala ± 2). Para cada localidad se observa la variación en la forma de la valva interna y externa, entre los hábitats, con su valor de la prueba de T^2 de Hotelling y su valor P correspondiente.

Tabla 2.1 Tabla resumen de la variación de la forma del módulo externo y del interno, para cada hábitat de las tres localidades .

Módulo externo

Riacho		Camarones		Comodoro	
Banco Natural	Cultivo	Banco Natural	Cultivo	Banco Natural	Cultivo
.Borde posterior retraído	.Borde posterior expandido	.Borde posterior levemente retraído	.Borde posterior levemente expandido	.Umbo desplazado ventralmente	.Umbo centrado
.Umbo centrado	.Umbo centrado	.Umbo centrado	.Umbo centrado	.Borde ventral retraído	
.Ligamento levemente retraído	.Ligamento levemente retraído	.Borde ventral retraído	.Borde ventral expandido		

Módulo interno

Riacho		Camarones		Comodoro	
Banco Natural	Cultivo	Banco Natural	Cultivo	Banco Natural	Cultivo
.MRP levemente alargado y desplazado hacia borde dorsal	.MRP desplazado hacia borde ventral	.MAP grande .MRP levemente retraído y desplazado hacia borde ventral	.MAP pequeño .MRP desplazado hacia borde dorsal	.MAP grande .MRP levemente retraído	.MAP pequeño .MRP levemente alargado

Para evaluar la tasa de error aparente en la asignación de un individuo a un grupo determinado *a priori*, se realizaron tablas de clasificación cruzada (tabla 2.2) donde se muestra en las filas el grupo al que pertenece la observación y en las columnas el grupo al que es asignado al usar la función discriminante. En líneas generales la función discriminante asignó correctamente un mayor porcentaje de observaciones al utilizar la configuración externa (76,63%) que la interna (45,34%). Dentro de la configuración externa, si se analiza de manera particular, los bancos naturales de Camarones (CaBN: 89,7%) y Comodoro (CoBN: 91,1%) tuvieron los porcentajes de asignación correcta más altos. El cultivo de Comodoro de la ACC tiene el mayor porcentaje (CoCM: 85,15%) de asignaciones correctas de los cultivos. En el caso de la configuración interna, los porcentajes de asignación correcta no superaron al 70% en ninguno de los grupos; los tres grupos de Comodoro presentaron los mejores porcentajes (CoBN: 67,33%, CoCM: 54,46%, CoCE: 53,85%).

Tabla 2.2 Tabla de clasificación cruzada para a) la configuración externa y b) la configuración interna. Se muestra el número de observaciones correctamente clasificados en cada grupo y los porcentajes de asignación correcta.

a)	CaBN	CaCE	CaCS	CoBN	CoCE	CoCM	RiBN	RiCC	Total	% asignación correcta
CaBN	87	1	1	2	1	0	5	0	97	89,70
CaCE	0	66	22	1	0	6	4	7	106	62,26
CaCS	0	15	68	0	0	4	1	5	93	73,12
CoBN	1	0	0	92	5	0	2	1	101	91,10
CoCE	2	1	1	10	73	5	7	5	104	70,20
CoCM	0	4	5	0	0	86	2	4	101	85,15
RiBN	8	6	4	0	4	3	76	6	107	71,03
RiCC	1	5	4	1	5	4	2	52	74	70,27
Total	99	98	105	106	88	108	99	80	783	

b)	CaBN	CaCE	CaCS	CoBN	CoCE	CoCM	RiBN	RiCC	Total	% asignación correcta
CaBN	28	8	6	9	18	3	14	11	97	28,87
CaCE	4	45	28	1	2	10	8	8	106	42,45
CaCS	4	27	43	0	0	2	4	13	93	46,24
CoBN	5	0	1	68	7	15	3	2	101	67,33
CoCE	12	2	2	11	56	12	6	3	104	53,85
CoCM	5	5	6	10	7	55	7	6	101	54,46
RiBN	15	12	11	8	12	3	43	3	107	40,19
RiCC	7	6	14	4	8	11	7	17	74	22,97
Total	80	105	111	111	110	111	92	63	783	

2.3.2 Sobre las variables ambientales y su relación con la forma

Se detallan en la tabla 2.3 los promedios de las variables ambientales del año de muestreo para las tres localidades. Se observa en las variables ambientales del submareal, que tanto la temperatura superficial del mar (SST) como la salinidad disminuyen de norte a sur (de Riacho a Comodoro), mientras que la clorofila aumenta en esa dirección. Respecto a las variables del intermareal, se observa un comportamiento opuesto entre las variables, la temperatura atmosférica disminuye levemente de norte a sur (de Riacho hasta Comodoro), mientras que el viento aumenta en esta misma dirección.

Tabla 2.3 Promedio anual de diferentes variables ambientales para cada localidad. T° atm hace referencia a la temperatura atmosférica, y SST a la temperatura superficial del mar.

Promedio anual 2015							
Localidad	Latitud Sur	Longitud Oeste	T° atm (°C)	Viento (m s-1)	SST (°C)	Salinidad (Kg m-2)	Clorofila (mg m-3)
Riacho	42°24'17"	64°37'05"	15,69	8,44	13,73	2,15E-05	1,32
Camarones	44°54'23"	65°36'10"	14,63	9,14	11,95	1,62E-05	1,87
Comodoro	45°57'41"	67°33'48"	14,02	9,92	9,66	1,29E-05	10,97

En el PCA realizado con las variables ambientales y las localidades (figura 2.14), puede observarse que, para ambos hábitats, el primer componente explica más del 90% separando en el caso del intermareal, al viento de la temperatura atmosférica y la irradiancia, y en el submareal a la clorofila de la salinidad y la temperatura superficial del mar (SST). En el intermareal, Camarones y Comodoro están más correlacionados positivamente al viento, y Riacho a la irradiancia y a la temperatura atmosférica. En el submareal, Comodoro está correlacionado positivamente a la clorofila, mientras que Camarones y Riacho a la salinidad y la temperatura superficial del mar.

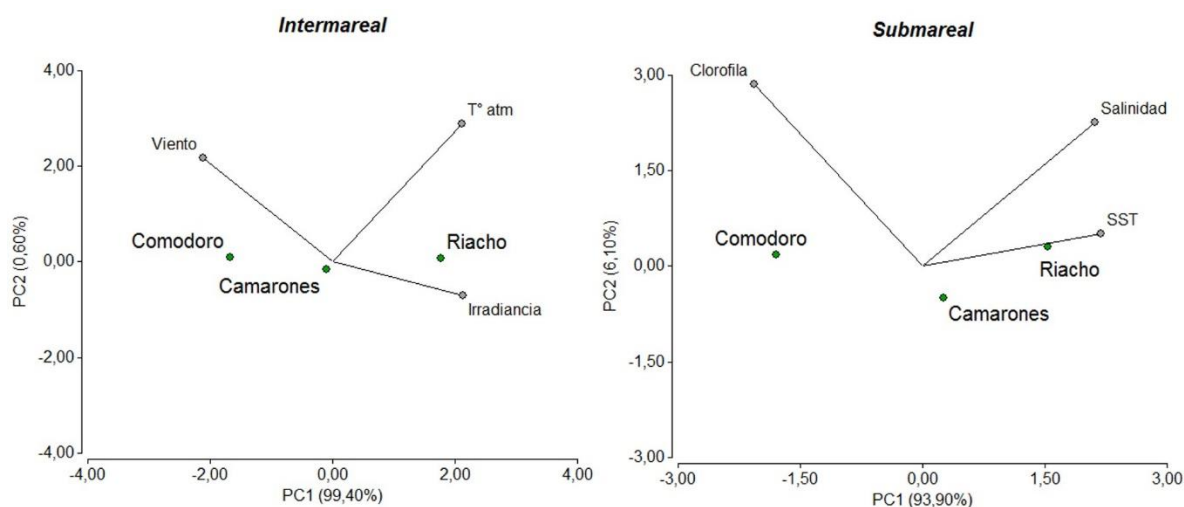


Figura 2.14 Análisis de componentes principales para las variables ambientales del intermareal y del submareal. T° atm hace referencia a la temperatura atmosférica y SST a la temperatura superficial del mar.

Los análisis de conglomerado respecto de la forma fueron realizados por separado para el módulo interno y externo y mostraron el mismo patrón, pero las distancias para el módulo interno fueron más cortas. Dado que el objetivo de este análisis fue comparar los patrones

del conglomerado de las variables ambientales con el de las variables de forma y, dado que ambos módulos muestran el mismo patrón, se decidió mostrar solo el del módulo externo. En los bancos naturales, las variables ambientales y las variables de forma no siguen el mismo patrón: la menor distancia en las variables ambientales se encuentra entre los bancos naturales intermareales de Camarones (CaBN) y Comodoro (CoBN) y Riacho es el más distante (figura 2.15a); mientras que en la forma, tanto externa como interna, la más distante es la localidad de Comodoro (CoBN; figura 2.15b).

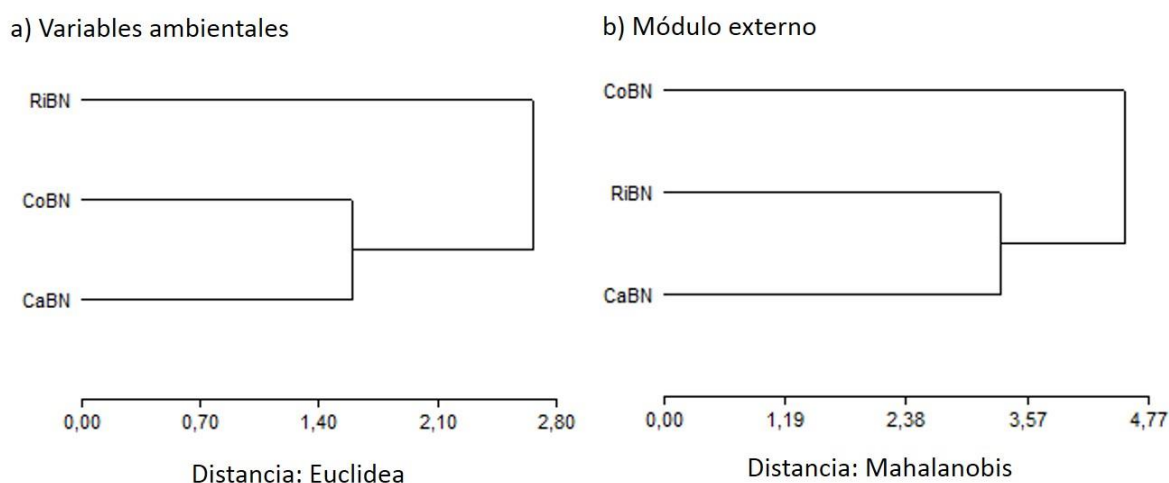


Figura 2.15 Análisis de Conglomerados jerárquico UPGMA dentro de los bancos naturales. a) variables ambientales (temperatura atmosférica, velocidad del viento, irradiancia). b) Variables de forma del módulo externo. RiBN: Riacho banco natural, CaBN: Camarones banco natural, CoBN: Comodoro banco natural.

Por el contrario, en los conglomerados de los cultivos hay correspondencia entre los patrones de las variables ambientales y de forma (figura 2.16). En este caso los cultivos de Comodoro son los más distantes en ambos conglomerados. En particular, en el conglomerado de variables ambientales (figura 2.16a) se observan tres grupos: los cultivos de Camarones, Riacho y los cultivos de Comodoro. El conglomerado de forma sigue el mismo patrón pero con el cultivo de la escuela de Comodoro (CoCE) como grupo más distante, separado del cultivo de ACC (CoCM).

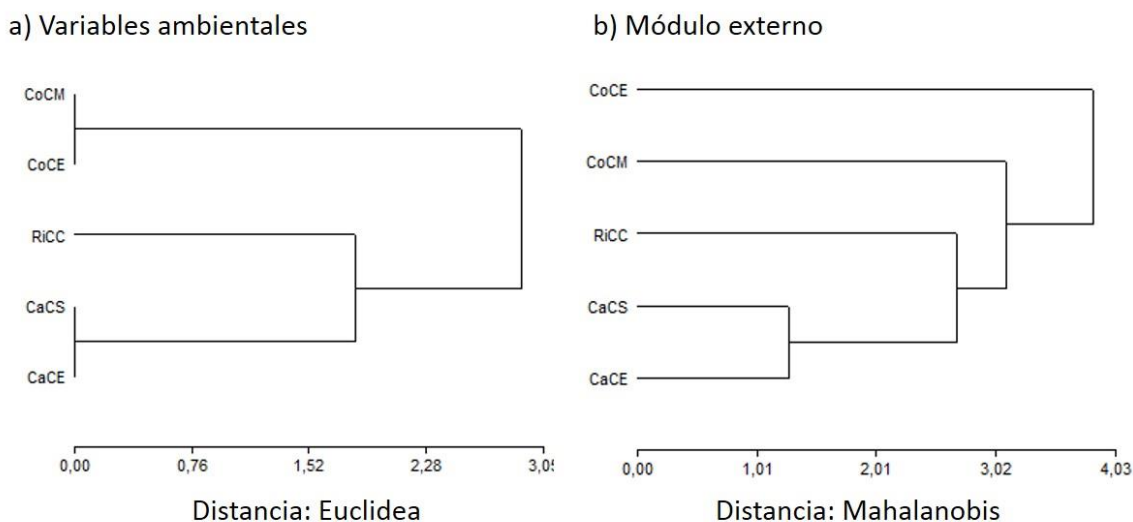


Figura 2.16 Análisis de Conglomerados jerárquico UPGMA dentro de los cultivos. a) variables ambientales (temperatura superficial del mar, clorofila, salinidad). b) Variables de forma del módulo externo. RiCC: Riacho cultivo en camas, CaCE: Camarones cultivo escuela, CaCS: Camarones cultivo Stephane, CoCE: Comodoro cultivo escuela, CoCM: Comodoro cultivo ACC.

2.4 Discusión

Se estudiaron los componentes de forma de la valva del mejillón de la provincia de Chubut que maximizan la separación a distintas escalas geográficas: entre sitios, entre localidades dentro de cada hábitat y dentro de cada localidad entre hábitats, asimismo se analizó la relación de dicha forma con el ambiente. La utilización de las técnicas de morfometría geométrica permitió comparar las distintas localidades productivas así como los distintos hábitats en los que se encuentra el mejillón del Chubut. El uso de esta técnica en conjunto con otras disciplinas (e.g. genética, marcado y recaptura, análisis químicos de tejidos etc.) (Cadrin y Friedland 1999) permitirá obtener un enfoque integral de los *stocks* fenotípicos en estudio.

En líneas generales, los sitios se relacionan respecto del módulo externo según hábitat (excepto el banco natural de Riacho) y según el módulo interno se observan tres grandes grupos, sin una asociación con la localidad o el hábitat. La menor distancia para ambos módulos fue para los cultivos de Camarones, lo cual era esperable dado que se encuentran en el mismo hábitat y a escasa distancia entre sí. En el módulo interno los sitios más distantes entre sí, que a su vez formaron el grupo divergente fueron el banco natural (CoBN)

y el cultivo de la escuela (CoCE) de Comodoro. Es importante destacar que el cultivo CoCE durante el año de muestreo no era un cultivo activo, estaba casi abandonado por complicaciones logísticas, y las líneas presentaban muchas algas y fauna acompañante (*fouling*), por otro lado CoBN fue el único banco natural que se encontró sobre un banco de *Perumytilus purpuratus*. Por otra parte, la falta de asociación de la distancia entre los sitios con las localidades y/o el hábitat, puede deberse a que los distintos productores de la provincia han compartido semillas de mejillón entre los distintos sitios con fines productivos. La escuela de Camarones posee un criadero (*hatchery*) el cual provee semillas, por ejemplo, para el cultivo privado de Stephane Sorroche (CaCS) y para el cultivo de ACC (CoCM). A su vez, se ha realizado un intercambio de semillas entre Stephane Sorroche y los pescadores de Riacho (Stephane Sorroche comunicación personal). Por lo tanto, el gran movimiento de semillas entre los distintos productores y bancos naturales generaría una homogenización genética y sugiere que el factor ambiental por sobre el genético sería el que está determinando la variación observada en la forma externa (plasticidad fenotípica). A su vez, por los análisis moleculares realizados sobre los mejillones de esta tesis (como se señala en la introducción general), sabemos que en su mayoría (salvo por 4 híbridos presentes en los cultivos) todos los mejillones muestreados pertenecen a la especie *Mytilus edulis*.

La variabilidad en la forma de la valva en los bivalvos, en general es una característica morfológica clave que refleja tanto la historia filogenética como los hábitos de vida (Stanley 1970). Dentro del género *Mytilus* ha sido estudiada tanto la diferenciación en forma según un gradiente latitudinal o según su hábitat sea cultivo o de bancos naturales (Innes y Bates 1999; Krapivka *et al.* 2007; Valladares *et al.* 2010). En el presente estudio, en líneas generales, los bancos naturales están representados por valvas más curvas con el umbo desplazado hacia el borde ventral, la zona posterior “achatada” y con un músculo aductor más desarrollado y un músculo retractor del pie más corto. En este espectro de formas, según los resultados obtenidos, la variación puede depender del tipo de intermareal (más o menos estresante), de la cantidad de estratos en donde se fijan los mejillones, y del

gradiente latitudinal o la localidad. Por otro lado, los cultivos muestran valvas más globosas con el umbo centrado, la zona posterior expandida y con músculos aductores reducidos, diferenciándose en la forma de la valva los métodos de cultivo (*longlines* o camas), y la localidad. Desde el trabajo pionero de Seed (1968) se sabe que los mejillones muestran variaciones morfológicas en respuesta a su entorno. En Chile, Valladares *et al.* (2010) realizaron un estudio aplicando morfometría geométrica en *M. chilensis* y encontraron diferencias en la forma de la valva asociadas al origen (silvestres vs. cultivados) y a la latitud, con patrones de variación de forma similares a los registrados en esta tesis. Con morfología clásica y analizando además la densidad, Kirk *et al.* (2007) también encuentran diferencias en la forma de la valva en *M. trossulus* de banco natural intermareal y de cultivo submareal. La diferenciación en la forma entre individuos del intermareal y submareal del norte de la Patagonia ha sido registrado también en otros moluscos, como en el gasterópodo *Trophon geversianus* (Márquez *et al.* 2015), en donde individuos sin diferencias genéticas muestran dos morfos uno intermareal y otro submareal, con distintas formas de la concha y respuestas conductuales a condiciones físicamente estresantes.

Las diferencias entre el banco natural intermareal y los cultivos submareales abarcan distintos factores ambientales. Dentro de los factores biológicos, la depredación es de los más importantes, y se ha demostrado que los mejillones usan varios mecanismos de defensa para reducir los riesgos de depredación (Beadman *et al.* 2003), como el desarrollo de grandes músculos aductores para aumentar el tiempo de apertura en respuesta a la depredación de estrellas de mar (Reimer y Tedengren 1996) y valvas más gruesas (Hulscher 1996; Kirk *et al.* 2007; Leonard *et al.* 1999). En los hábitat submareales del norte de Patagonia el estrés físico es menor que el del intermareal, aunque la presión de depredación es mayor (Márquez *et al.* 2015). En esta tesis las muestras submareales provienen de cultivos en *longlines* (Camarones y Comodoro) y en camas (Riacho) y los sistemas de cultivo pueden actuar como refugio contra estrellas de mar, cangrejos u otros depredadores de invertebrados que no pueden acceder a líneas suspendidas (Kirk *et al.* 2007). Además de la depredación por aves, como el ostrero *Haematopus leucopodus*, en el norte de Chubut el

mayor depredador de *Mytilus edulis* es el gasterópodo *Trophon geversianus*, y en las costas del sur de la provincia se le suma la estrella de mar *Anasterias minuta* (Zaixso 2015). Valladares *et al.* (2010) demostraron la relación entre el tamaño de la cicatriz del músculo aductor posterior y el peso del mismo, encontrando músculos aductores más desarrollados en mejillones procedentes de bancos naturales, en coincidencia con los resultados de este capítulo. Esto indicaría que en estas poblaciones la energía estaría asignándose preferentemente hacia un mayor crecimiento muscular como un atributo relacionado directamente con la supervivencia individual (Valladares *et al.* 2010) ya sea para protegerse de los depredadores o de las condiciones ambientales adversas. En relación con los factores físicos, los bancos naturales intermareales están afectados por amplitudes de mareas, desecación y, además, por la fuerza del oleaje, que pueden tener efecto sobre la valva de los mejillones. En *M. trossulus* se encontró variación en la forma (altura, grosor y tamaño de ligamento) entre sitios expuestos al oleaje y sitios más protegidos (Akester y Martel 2000). El tamaño del músculo aductor también estaría relacionado a la desecación sufrida por los mejillones en el intermareal, ya que estos están contraídos para cerrar las valvas durante las mareas bajas y relajados para abrir las valvas y alimentarse cuando la marea esta alta y los mejillones sumergidos, generando músculos aductores más desarrollados en los mejillones intermareales.

En el mejillón chubutense, la forma de la valva podría estar relacionada con un conjunto complejo de condiciones oceanográficas, que incluyen la exposición al oleaje, disponibilidad de alimento, salinidad y temperatura del agua, entre otras. En esta tesis no se registró la fuerza del oleaje, pero teniendo en cuenta los vientos dominantes y el tipo de ambiente (sea mar abierto, golfo o caleta) se puede inferir la fuerza del oleaje que sufren los intermareales en cuestión. Así, el intermareal de Comodoro que exhibe una gran influencia de la velocidad del viento y presenta los vientos más fuertes, además de encontrarse dentro del Golfo San Jorge, el cual podría considerarse mar abierto si se compara con la caleta donde se ubica el intermareal de Camarones y el Golfo San José donde se encuentra el intermareal de Riacho, presentaría mayor fuerza de oleaje que estos. La forma externa de

la valva de los mejillones de Comodoro fue estrecha, con los bordes dorsal y ventral rectos y el umbo desplazado ventralmente, coincidiendo con los resultados expuestos por Steffani y Branch (2003) quienes registraron, usando morfometría clásica, que la valva de *M. galloprovincialis* fue más estrecha y baja en mejillones de sitios expuestos, concluyendo que tal vez de esta manera se reduciría el efecto de las fuerzas hidrodinámicas, reduciendo el área sobre la cual actúa el oleaje, siendo una respuesta al aumento del riesgo de desprendimiento. A su vez, Comodoro fue el sitio donde se registraron los valores más altos de clorofila y esto puede deberse a que en la zona donde la acción del oleaje es fuerte, los flujos de agua son mayores y por lo tanto transportan un mayor cantidad de materia particulada que en áreas protegidas (Bertness y Leonard 1997; Fréchette y Bourget 1985; Fréchette *et al.* 1989). Por otro lado, Telesca *et al.* (2018) observaron que la forma de la valva era más estrecha y alargada en ambientes con temperatura y salinidad decreciente, coincidiendo con el patrón observado en esta tesis, donde el gradiente de salinidad y temperatura coincide con el gradiente latitudinal de las localidades, disminuyendo desde Riacho hacia Comodoro y observando que la forma externa de la valva en los mejillones de Riacho son más globosas.

Más allá de lo expuesto en el párrafo anterior, en la comparación de los patrones de agrupamiento de los bancos naturales entre las variables ambientales y la forma no se observan coincidencias. En el conglomerado de variables ambientales, además las distancias coinciden con el gradiente latitudinal, siendo Camarones y Comodoro las localidades menos distantes. Riacho por su parte es el punto más al norte, su ubicación en el rincón Oeste del golfo San José le provee protección de los vientos y el oleaje, exhibiendo mayores temperaturas atmosféricas y menor intensidad de viento. El viento es la variable que asocia a Camarones y Comodoro, además, como se mostró en la tabla 2.2 el viento para estos sitios fue similar y al mismo tiempo ambos son intermareales rocosos. A diferencia de los demás, el intermareal del Riacho es de fondo fangoso, que genera un humedal que haría que la desecación o exposición durante las mareas bajas sea menos extrema. Respecto de las formas de las valvas de los bancos naturales, el mejillón de Comodoro (CoBN) es el más

distante, y esto puede deberse a que el intermareal de Comodoro sería el más hostil. Respecto a las distancias de las variables ambientales y de la forma entre los sitios de cultivos, se observó un comportamiento similar. En el conglomerado referido a las variables ambientales, Comodoro es el más distante, coincidiendo con que es la localidad más al sur, con las variables ambientales más extremas. Respecto de la forma, los cultivos en *longline* de Camarones presentan la menor distancia (CaCE, CaCS), seguidos por el cultivo de Riacho (RiCC) y luego por el cultivo de ACC (CoCM), siendo el más distante en forma el cultivo de la escuela de Comodoro (CoCE).

A pesar del gran impulso que se le está brindando al cultivo de los mejillones en la provincia de Chubut, hay poca información disponible sobre la estructura genética de sus poblaciones y la diferenciación en forma entre las localidades, o en como las variables ambientales locales pueden afectarlos. Con los resultados expuestos en este capítulo, se corrobora que los mejillones de la provincia de Chubut se diferencian en su forma según la localidad y según su hábitat sea banco natural intermareal o de cultivo. Además, se propone que la utilización de la configuración de *landmarks* externos (módulo externo) es la mejor opción para esta diferenciación, ya que fue la que arrojó los mayores porcentajes de asignación correcta de los grupos propuestos *a priori*. Las diferencias en la forma de la valva entre mejillón cultivado y natural en la provincia de Chubut, sumado al hecho de ser una misma especie, sugiere una importante influencia de los factores ambientales en el modelado de la forma de sus valvas.

El etiquetado del producto es la fuente de información básica para determinar la especie que está presente en el producto, identificar su origen geográfico y seguirlo a través de la cadena de valor (trazabilidad) (Larraín *et al.* 2014). Se necesitan tecnologías novedosas para evaluar las especies e identificar sus orígenes geográficos (Fischer y Fisher 2013). Generalmente, para la identificación del producto comercial, se utilizan biotecnologías moleculares (Lockely y Bardsley 2000), pero estos métodos no solo son costosos, sino que también requieren recursos humanos especializados para su aplicación (Ibañez *et al.* 2007). Diversos trabajos proponen el uso de técnicas de morfometría geométrica como

herramienta para realizar estas determinaciones. Por ejemplo, Ibañez *et al.* (2007) utiliza esta técnica aplicada en las escamas de peces para la identificación de especies y su origen geográfico. También, Francoy *et al.* (2011) demostraron la eficacia de la morfometría geométrica en la asignación correcta de las colonias de abejas (*Melipoma beecheei*) tanto al origen geográfico como a sus grupos de haplotipos y la proponen como herramienta de primer paso, en lugar de los métodos moleculares más costosos en tiempo y dinero, dejando este tipo de análisis solo para identificaciones dudosas. De igual manera, en esta tesis aplicando morfometría geométrica en *M. edulis*, los resultados mostraron que con la forma externa de la valva se puede diferenciar el origen geográfico de los mejillones en la provincia de Chubut (i.e poblaciones fenotípicas), incluso si son de banco natural o de cultivo. Recientemente, ha aumentado el interés en investigar la posibilidad de que los datos provenientes de la morfometría geométrica sean incorporados a redes neuronales artificiales para lograr la clasificación de individuos a grupos preconcebidos (Baylac *et al.* 2003; Bignon *et al.* 2005; Dobigny *et al.* 2002; Soda *et al.* 2017; van den Brink y Bokma 2011), por ejemplo, para reconocer de manera rápida y eficaz el origen geográfico. Por lo tanto, se propone la implementación de la morfometría geométrica, como herramienta para desarrollar un sistema de fácil reconocimiento del producto comercial, generando una denominación de origen para lograr que la trazabilidad del producto sea más sencilla.

En el siguiente capítulo se buscará dilucidar si los mejillones procedentes de estas tres localidades de la provincia de Chubut difieren también en sus índices de condición, indagando sobre la relación entre los mismos y la forma de la valva.

Capítulo 3: Cálculos de los índices de condición y rendimiento en tres localidades de la provincia de Chubut

3.1 Introducción

“Además del interés teórico, el conocimiento de las leyes de la variabilidad de algunos atributos de las poblaciones es necesario para trabajos relativos a la explotación de los recursos. Atributos como la variación en la tasa a la que la materia viva se acumula, el tamaño del individuo, la longevidad, primera fertilidad, etc., hace también al conocimiento de la ecología de la población, la productividad de las aguas, el valor comercial del recurso y la capacidad de proveer materia prima a la industria” expone Penchaszadeh (1974) en su tesis doctoral. A este respecto, el estudio de diferentes índices de condición (IC) permite conocer cómo responde el organismo bajo estudio ante variaciones ambientales (Acosta *et al.* 2006), al mismo tiempo, bajo una perspectiva comercial, se los utiliza para estimar el valor del organismo para su explotación y consumo (Cruz y Villalobos 1993); generalmente estos índices son proporcionales a la talla. En los mejillones, las diferentes características de la pulpa, como cantidad y calidad o composición bioquímica de la carne e índices de condición están asociadas, intrínsecamente, a la reproducción y ciclos de utilización y almacenamiento de energía y, extrínsecamente, a la disponibilidad de alimento y a la temperatura (Acosta *et al.* 2006; Arrieche *et al.* 2002; Prieto *et al.* 1999). Estacionalmente el índice de condición aumenta durante el período de almacenamiento de energía y gametogénesis y disminuye con el evento de desove principal (Gosling 2003).

En el golfo San José, Trancart (1978) señala que el período de actividad sexual de esta especie comienza a principios del invierno y termina a finales de primavera; el desove principal tiene lugar en los meses de agosto-septiembre y uno secundario ocurre en noviembre y diciembre (Zaixso 2015). En términos generales, el fin de los desoves es seguido de un período de reposo sexual hasta el mes de mayo, momento en que se inicia el desarrollo de nuevos folículos que alcanzarán su madurez en agosto (Zaixso 2015). Los diferentes estadios reproductivos están correlacionados con la temperatura del agua, en tanto que el reposo sexual se encontró asociado a períodos de bajas concentraciones de clorofila “a” (Zaixso 2015). Según el personal docente de la Escuela n° 721, en Camarones el mejillón desova a fines de noviembre o durante todo diciembre y, generalmente, se

realiza la cosecha en mayo. Mientras que en el Golfo San Jorge, en el mes de julio los mejillones se hallan en una etapa media de la gametogénesis y comienzan a ser visibles las diferencias de color de las gónadas de machos y hembras (Colombo *et al.* 2016; Vinuesa 1979).

Asimismo, a nivel comercial existe un aprovechamiento de la pulpa del mejillón en distintos estadios. Según Stephane Sorroche de Granja Marina San Julián (comunicación personal), para comercializar el mejillón en escabeche es bueno que la pulpa esté sin demasiada grasa o huevos (IC bajos); sin embargo, para comercializar la pulpa en otros formatos es importante que esta sea grande y de buena condición (mayores IC). Entonces, los índices de condición en acuicultura tienen un fin económico, en donde el índice es un referente de la calidad comercial del producto y un fin ecofisiológico en el cuál el índice es usado para caracterizar el aparente grado de salud de la población bajo estudio (Tirado y Macias 2006).

Desde hace tiempo se recomienda la relación entre el peso de la carne seca y el peso de la valva como un índice estático, donde valores bajos de este índice reflejan déficit de energía como resultado del estrés ambiental o la pérdida de gametos (Brown y Hartwick 1988; Lucas y Beninger 1985; Mann 1978). Esta relación (peso de la carne / peso de la valva) es una medida importante del estado fisiológico de los mejillones y la asignación relativa de recursos al crecimiento de tejido o de valva (Raubenheimer y Cook 1990; Seed y Suchanek 1992). Dado que los moluscos bivalvos son filtradores, sus requisitos de calidad dependen principalmente de la calidad del ambiente que los rodea, asegurando un producto saludable y un consumo seguro (Orban *et al.* 2002). En particular, las características fisiológicas de los mejillones varían considerablemente entre diferentes sitios geográficos y según su ubicación sea inter o submareal (Steffani y Branch 2003). Existen varios trabajos que comparan índices de condición entre individuos del inter y el submareal (Camacho *et al.* 1995; Kirk *et al.* 2007; Labarta *et al.* 1997; Lafrance *et al.* 2003; Valladares *et al.* 2010). Un ejemplo es el de Arranz *et al.* (2016), que encontraron que los individuos del submareal asignaban sus recursos energéticos preferentemente al crecimiento de carne, con índices de condición más altos, mientras que los mejillones procedentes del intermareales

designaban mayor esfuerzo en la calcificación y el engrosamiento de la valva, dando como resultado valvas más pesadas.

Los mejillones toleran una amplia gama de condiciones ambientales ajustando sus respuestas fisiológicas para lograr tasas máximas de crecimiento (Labarta *et al.* 1997). Las condiciones de hábitat intermareal generalmente incluye a la desecación, las temperaturas extremas y la exposición al oleaje; estos estresores provocan que los bivalvos en general, y los mejillones en particular, generen un engrosamiento de la valva en zonas intermareales más altas (Beadman *et al.* 2003) o en áreas con fuerte acción de las olas (Akester y Martel 2000). En cambio, los mejillones submareales no solo crecen más rápido que los mejillones intermareales, sino que también desarrollan valvas más finas (Seed 1968). Además, la depredación es un factor que también influye en la morfología de las valvas: mejillones expuestos a una fuerte depredación desarrollan valvas más gruesas y más robustas como respuesta antidepredatoria (Leonard *et al.* 1999). A su vez, las variaciones en el fenotipo también dependen del tipo de depredadores, los cuales pueden variar a una escala local. Por ejemplo, en la zona del intermareal alta e intermedia, los gasterópodos y las aves son los depredadores más abundantes (Dixon *et al.* 1995; Wieters y Navarrete 1998); mientras que en el intermareal bajo y en la zona submareal las estrellas de mar y los cangrejos son los depredadores más significativos (Navarrete y Menge 1996; Reimer y Tedengren 1997). Además de cambios en la valva, se observó que *M. edulis* aumenta el volumen del biso en respuesta a las señales transmitidas por el agua de *Cancer pagurus* y *Carcinus maenas* (Côté 1995; Leonard *et al.* 1999).

También la densidad es un factor ambiental particularmente importante que influye en la forma de la valva y en los índices de condición del género *Mytilus* (Brown *et al.* 1976; Seed 1968, 1973). Las densidades en los sistemas de cultivo suelen ser significativamente más altas que en los bancos naturales (Connell 2001; Glasby y Connell 2001; Holloway y Connell 2002), ya que en los ambientes naturales las densidades son reguladas por diferentes factores ambientales, como la depredación, tolerancia a la desecación, oleaje, etc. (Cubillo *et al.* 2012a). Sin embargo, en los sistemas de cultivo, a medida que los individuos aumentan

su tamaño se realizan reducciones sucesivas en la densidad de mejillones de las cuerdas, proceso conocido como “desdoble” (ver sección de metodología general). El desdoble se lleva a cabo cuando los mejillones han alcanzado aproximadamente 40–60 mm de longitud y el peso de las cuerdas ha aumentado significativamente haciendo que el crecimiento del mejillón sea más lento y heterogéneo (Cubillo *et al.* 2012a). Alunno-Bruscia *et al.* (2001) observaron que la densidad influyó en la morfología de la valva y el índice de condición de *M. edulis* cultivados en laboratorio. Existe una correlación negativa entre el tamaño corporal del individuo y la densidad de la población, esto es debido a que los requerimientos de espacio o alimento generalmente aumentan con el tamaño (Alunno-Bruscia *et al.* 2001).

En este capítulo se evaluaron las diferencias en distintos índices de condición, rendimiento en carne y densidades entre mejillones de sistemas de cultivos y bancos naturales de tres localidades de la provincia de Chubut.

3.2 Materiales y Métodos

Los sitios de muestreo fueron descriptos en la sección metodología general. Sin embargo, cabe aclarar y recordar que todos los bancos naturales fueron intermareales bajos, con diferentes características hidrográficas entre ellos. Por otro lado, de los cultivos en *longlines*, el cultivo de la Escuela de Comodoro (CoCE) en el año de muestreo, no tuvo un mantenimiento adecuado de las líneas por complicaciones logísticas.

3.2.1 Sobre el peso de la valva

En el laboratorio, se separaron las valvas de la pulpa siguiendo el protocolo detallado en la sección metodología general. Para todos los individuos se registró la longitud total (LT) de la valva (cm), el peso de pulpa húmedo (PPH) y el peso de la valva (PV) por separado (0,01 g). Las variable a analizar PV fue relativizada al tamaño, dividiendo los valores por el *centroid size* (CS) correspondiente. Entonces se comparó el PV/CS entre los sitios y las significancias estadísticas ($P < 0,05$) fueron evaluadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Zar 1999), ya que no se cumplieron los supuestos para las pruebas paramétricas. Para determinar cuáles de los sitios fueron los que ocasionaron las diferencias significativas, se realizaron

comparaciones de a pares de subgrupos según Conover (1999). Los análisis estadísticos se ejecutaron con el *software* Infostat (Di Rienzo *et al.* 2012).

3.2.2 Sobre los índices de condición

Es necesario aclarar que las comparaciones de los índices de condición se realizaron dentro de cada localidad, entre sus hábitat (banco natural /cultivo). Se tomó esta decisión debido a que el muestreo fue realizado una única vez, en diferentes meses en cada sitio (tabla 3.1) y sin evaluar el estadio reproductivo a nivel histológico, por consiguiente no sería óptimo compararlos.

Tabla 3.1 Meses de muestreo en cada sitio.

<i>Localidad</i>	<i>Fecha de muestreo</i>
<i>Riacho</i>	Marzo 2015
<i>Camarones</i>	Abril 2015
<i>Comodoro</i>	Mayo 2015

En el laboratorio, con el objeto de realizar los cálculos de índices de condición (IC) y rendimiento, se registraron de cada individuo los valores de LT, ancho y alto de las valvas, utilizando un calibre digital (precisión de 0,01 mm). Inmediatamente, en una balanza (precisión de 0,01 g) se registró el peso total (PT= PV + PPH). Luego, se separó la valva de la pulpa para registrar por separado el PV y el peso de la pulpa, en este último caso, se registró el PPH y el peso seco (PPS; obtenido a 60°C en estufa hasta peso constante). Los índices calculados fueron:

$$IC1 = PPS \times 100 / LT^3$$

$$IC2 = PPS \times 100 / PV$$

$$IC3 = PT \times 100 / PV$$

$$\% \text{ Rinde} = (PPH / PT) \times 100$$

La significancia estadística entre cada hábitat dentro de cada localidad, se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Zar 1999) ya que no se cumplieron los supuestos para las pruebas paramétricas. Los resultados se presentan en gráficos de puntos donde se compara la media muestral y el error estándar entre hábitat dentro de cada localidad para cada índice y el rendimiento en carne. Los análisis estadísticos se realizaron en el *software* Infostat (Di Rienzo et al. 2012).

3.2.3 Sobre las densidades

En los bancos naturales, al igual que en el cultivo en camas de Riacho, las muestras fueron colectadas utilizando cuadrantes de 25 x 25 cm ($n=10$), de donde se extrajeron todos los mejillones. Por otro lado, en los cultivos en *longline*, se cosecharon los mejillones que se encontraban en los primeros 25 cm de la cuerda ($n=6$). Dado que las densidades de los bancos son en cm^2 y de los cultivos en *longline* solo se registró número de individuo en cm lineales, las comparaciones de densidad se hicieron dentro de los bancos naturales (y el cultivo de Riacho) y dentro de los cultivos en *longline*. Todos los cálculos se realizaron en el *software* Infostat (Di Rienzo et al. 2012). Para comparar y conocer la significancia estadística se realizó un ANOVA dentro de los bancos naturales y el cultivo de Riacho y dentro de los cultivos en *longline*, además se realizó la prueba de Tukey como método de comparaciones múltiples *a posteriori*. En el caso de que no se cumplieran los supuestos para poder realizar las pruebas paramétricas, los datos fueron transformados y de persistir el incumplimiento de los mismos, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Zar 1999). Para la significancia de los resultados ($P < 0,05$) se aplicó una comparación de a pares de subgrupos según Conover (1999).

3.3 Resultados

3.3.1 Sobre el peso de la valva

El PV relativo al *centroid size* fue significativamente diferente entre los grupos ($H_{cs}=79,10$, $P < 0,0001$; figura 3.1). Los mayores PV fueron para el banco natural de Camarones (CaBN) y los cultivos en *longline* CaCS y CoCM, sin diferencias significativas entre ellos. Luego con valores decrecientes se encontraron el cultivo y el banco natural de Riacho (RiCC y RiBN

respectivamente), seguidos, sin diferencias significativas entre ellos, del cultivo de la escuela de Camarones (CaCE) junto con el banco natural (CoBN) y el cultivo de la escuela de Comodoro (CoCE).

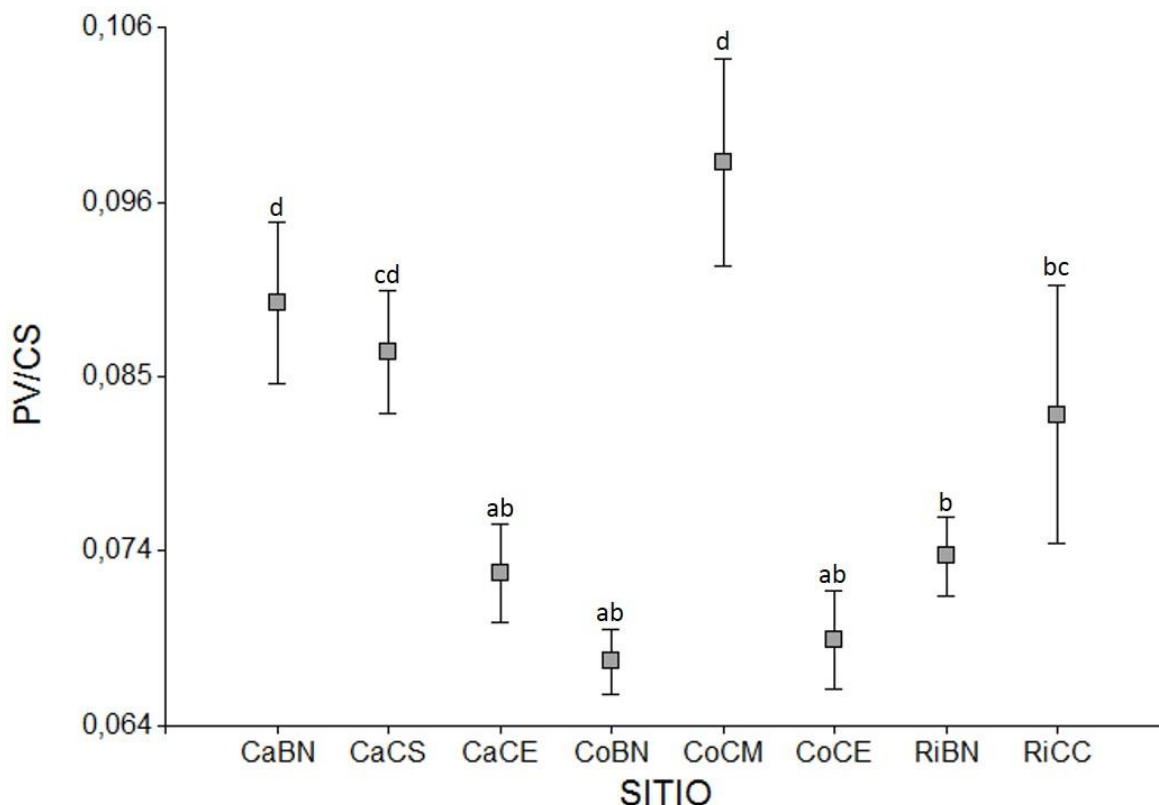


Figura 3.1 Gráfico de puntos (media \pm error estándar) del peso de la valva (PV) sobre el *centroid size* (CS), para todos los sitios de muestreo. CaBN: Camarones Banco Natural, CaCS: Camarones Cultivo Stephane Sorroche, CoBN: Comodoro Banco Natural, CoCM: Comodoro Cultivo ACC, CaCE: Camarones Cultivo Escuela n° 721, CoCE: Comodoro Cultivo Escuela n° 704, RiBN: Riacho Banco Natural, RiCC: Riacho Cultivo en Camas. Letras distintas corresponden a diferencias significativas ($P < 0,05$) encontradas mediante los contrastes de a pares realizados *a posteriori*.

3.3.2 Sobre los índices de condición

Los tres índices de condición y el rendimiento difirieron significativamente entre los dos hábitats de Riacho (Kruskal-Wallis: IC1- $\rightarrow H = 32,41$; IC2- $\rightarrow H = 62,47$; IC3- $\rightarrow H = 43,51$; % Rendimiento - $\rightarrow H = 43,51$, con $P < 0,0001$ para todos los casos). Como se observa en la figura 3.2, los valores fueron en todos los casos significativamente mayores para el cultivo (RiCC).

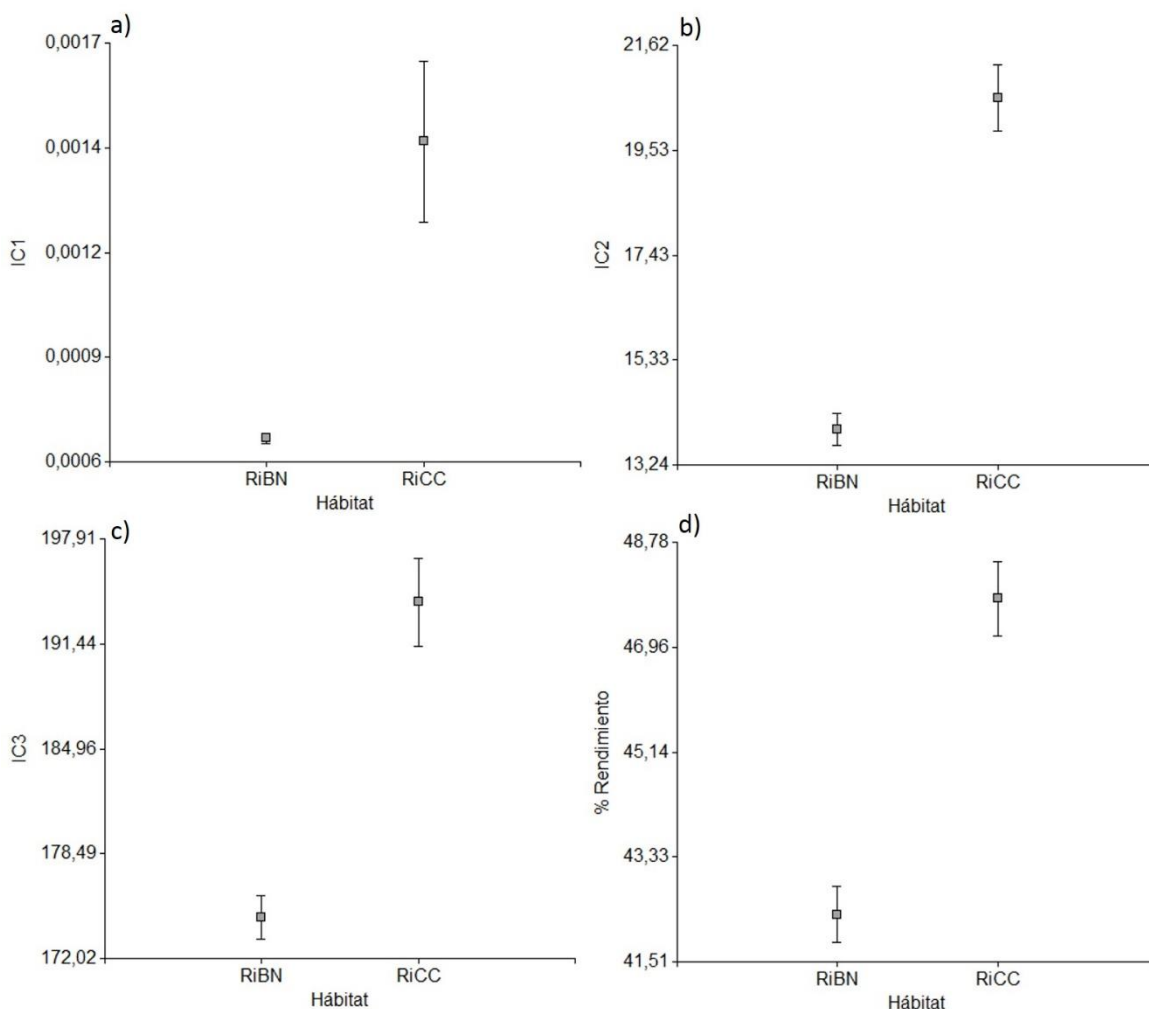


Figura 3.2 Riacho. Gráficos de puntos (media \pm error estándar) de los índices de condición y el rendimiento en carne para el banco natural (RiBN) y el cultivo (RiCC) de Riacho. a) IC1= Peso Seco \times 100/L3. b) IC2= Peso Seco \times 100/Peso Valvas. c) IC3 = Peso Total \times 100/Peso Valvas. d) % Rendimiento = (Peso Húmedo / Peso Total) \times 100.

Dentro de Camarones también se registraron diferencias estadísticamente significativas entre el banco natural y los cultivos (figura 3.3), siendo en todos los casos los valores mayores para los cultivos. El cultivo de Sorroche (CaCS) y el cultivo de la escuela (CaCE) no obtuvieron diferencias significativas en el IC3 ni en el rendimiento en carne (Prueba de Kruskal-Wallis: IC1- \rightarrow $H= 108,55$, $P< 0,0001$; IC2- \rightarrow $H= 161,50$, $P< 0,0001$; IC3- \rightarrow $H= 151,20$, $P< 0,0001$; % Rendimiento- \rightarrow $H= 158,27$, $P< 0,0001$).

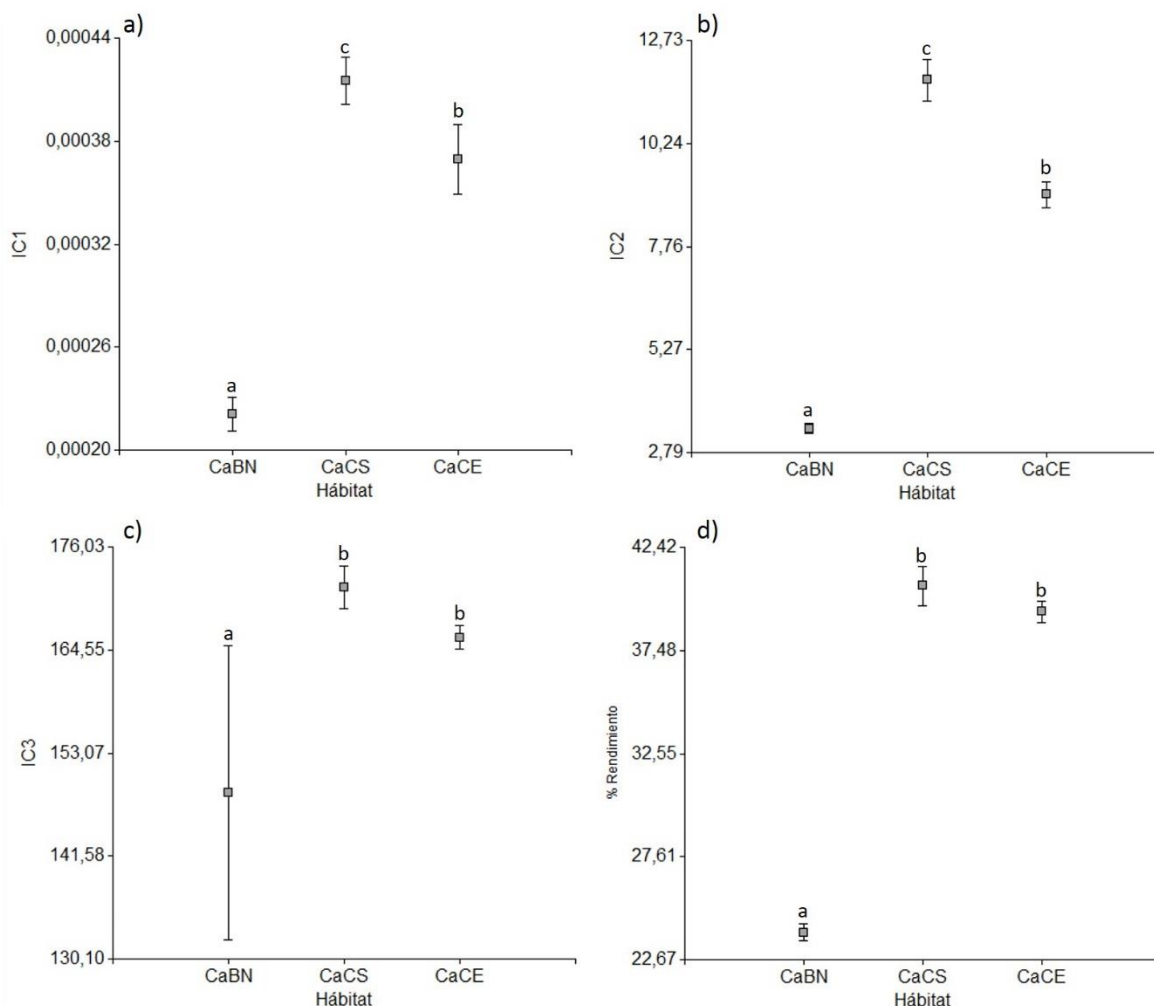


Figura 3.3 Camarones. Gráficos de puntos (media \pm error estándar) de los índices de condición y el rendimiento en carne para el banco natural (CaBN) y los cultivos (CaCS/CaCE) de Camarones. a) IC1=Peso Seco \times 100/L3. b) IC2=Peso Seco \times 100/Peso Valvas. c) IC3 =Peso Total \times 100/Peso Valvas. d) % Rendimiento = (Peso Húmedo / Peso Total)*100. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

En la figura 3.4 se muestran los resultados para la localidad de Comodoro. Se observa que los cultivos obtuvieron los mayores valores, estadísticamente significativos, de índices de condición y rendimiento en carne, menos en el IC1, donde el cultivo CoCM presentó el menor valor. Por otro lado, en el IC2 los dos cultivos no mostraron diferencias significativas entre sí (Prueba de Kruskal-Wallis: IC1- $\rightarrow H= 126,68, P < 0,0001$; IC2- $\rightarrow H= 141,72, P < 0,0001$; IC3- $\rightarrow H=142,76, P < 0,0001$; % Rendimiento- $\rightarrow H= 142,76, P < 0,0001$).

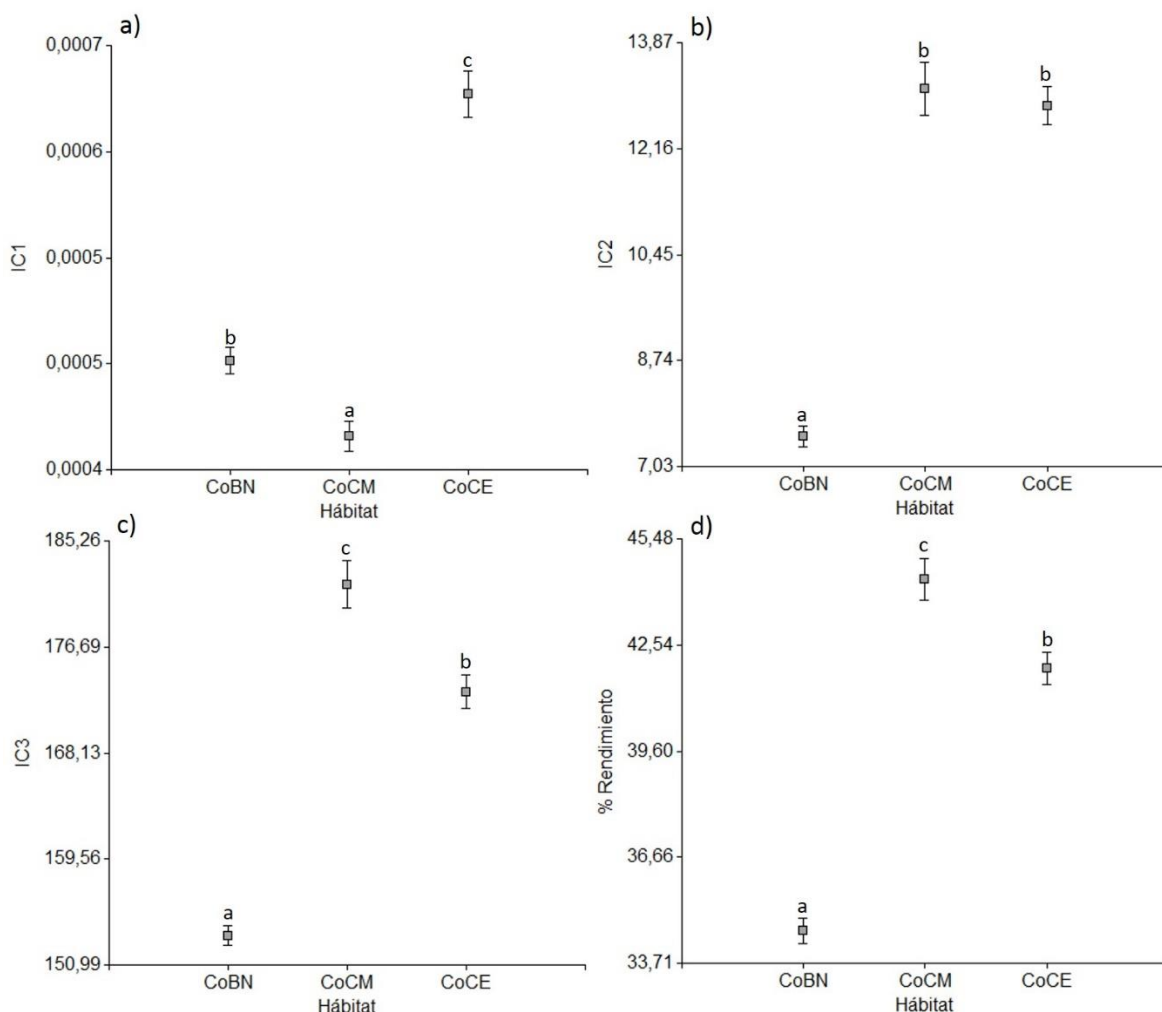


Figura 3.4 Comodoro. Gráficos de puntos (media \pm error estándar) de los índices de condición y el rendimiento en carne para el banco natural (CoBN) y los cultivos (CoCM/CoCE) de Comodoro. a) $IC1 = \text{Peso Seco} \times 100 / L3$. b) $IC2 = \text{Peso Seco} \times 100 / \text{Peso Valvas}$. c) $IC3 = \text{Peso Total} \times 100 / \text{Peso Valvas}$. d) $\% \text{ Rendimiento} = (\text{Peso Húmedo} / \text{Peso Total}) \times 100$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

3.3.3 Sobre las densidades

En la tabla 3.2 se detallan los valores de densidades promedios para los bancos naturales y el cultivo de Riacho y los números de individuos para los cultivos en *longline*.

Tabla 3.2 Densidades promedio en los bancos naturales y número de individuo en cultivos en *longline*. CaBN: Camarones Banco Natural, CaCS: Camarones Cultivo Stephane Sorroche, CoBN: Comodoro Banco Natural, CoCM: Comodoro Cultivo ACC, CaCE: Camarones Cultivo Escuela n° 721, CoCE: Comodoro Cultivo Escuela n° 704, RiBN: Riacho Banco Natural, RiCC: Riacho Cultivo en Camas.

Sitio	Densidad Promedio Banco Natural (25 cm ²)	N° de ind. Cultivo <i>Longline</i> (25 cm)
CaBN	45,3	-
CoBN	35	-
RiBN	65,8	-
CaCE	-	37,6
CaCS	-	63,6
CoCE	-	49,3
CoCM	-	20,2
RiCC	7,6	-

En el caso de la comparación entre los bancos naturales y el cultivo de Riacho se realizó un ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) para comparar las densidades ($H= 19,73$; $P= 0,0002$; figura 3.5). Como era de esperar por lo observado en el muestreo, el cultivo de Riacho (RiCC) presentó el menor valor en densidad, estadísticamente significativo, no habiendo diferencias estadísticas entre los tres bancos naturales.

Para la comparación entre los cultivos en *longline* sí se cumplieron los supuestos de normalidad ($W= 0,95$, $P= 0,5765$) y homocedácea ($F= 1,97$, $P= 0,1619$). En el ANOVA el valor de $P= 0,2104$ no rechazó H_0 , y por lo tanto las medias de densidades en cultivo en *longline* no presentaron diferencias estadísticas.

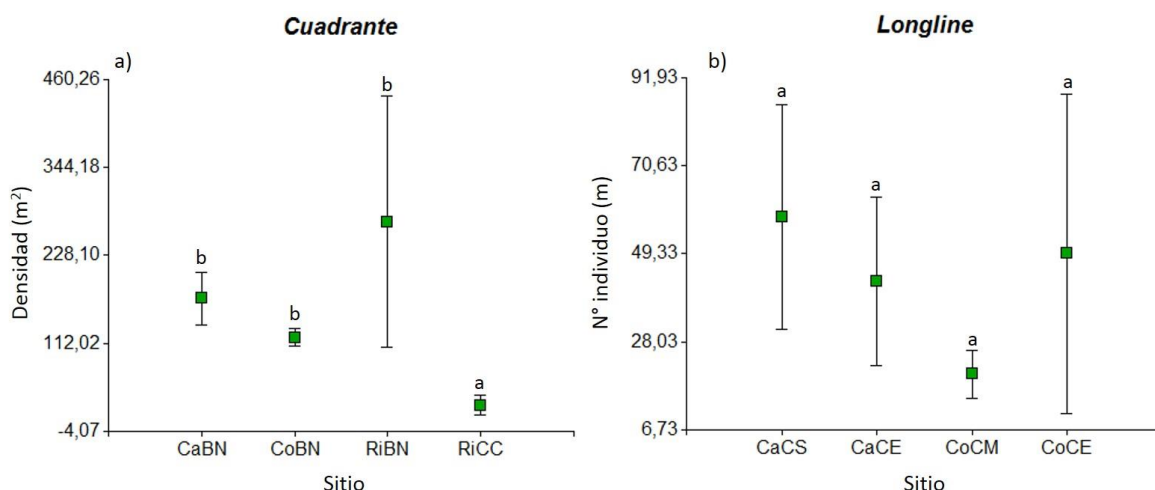


Figura 3.5 Gráfico de puntos (media \pm el desvío estándar) de la densidad para cada sitio en donde el muestreo fue utilizando a) cuadrantes y b) *longlines*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

3.4 DISCUSIÓN

Los índices de condición y el rendimiento en carne en los bivalvos son utilizados para estimar el valor del organismo para su explotación y consumo (Cruz y Villalobos 1993), así como para conocer el estado fisiológico de la población. Los mejillones procedentes de los cultivos en *longline* del Chubut CoCM y CaCS presentaron mayores pesos de valva y generalmente mayores índices de condición en comparación con mejillones procedentes de bancos naturales intermareales. Estos resultados se relacionarían con una mayor disponibilidad de alimentos en sitios con mayor flujo de agua (Steffani y Branch 2003). El hábito sésil de los mejillones hace que su composición química, sus índices de condición y su crecimiento en general sean estrictamente dependientes de los recursos de fitoplancton disponibles y, por lo tanto, de la temporada de cosecha (Orban *et al.* 2002). Las condiciones ambientales (depredación, disponibilidad de alimento, exposición al oleaje o circulación de agua y la edad de los individuos, entre otros) tienen un impacto importante tanto en las partes blandas de los mejillones (en el crecimiento y la reproducción, por lo tanto en los IC) como en la morfología de la valva (Bayne *et al.* 1983; Griffiths y Griffiths 1987; Hawkins *et al.* 1992; Seed y Suchanek 1992).

En varias especies de bivalvos, en general se ha registrado un mayor peso de valva en individuos de bancos naturales, relacionado con una mayor presión de depredadores en estos ambientes (*M. chilensis*, Valladares *et al.* (2010); *Placopecten magellanicus*, Lafrance *et al.* (2003); *Pecten maximus*, Grefsrud y Strand (2006). Por el contrario, en los resultados expuestos en este capítulo, dos de los cultivos en *longline* (escuela de Camarones, CaCE y cultivo de ACC, CoCM) junto con los del banco natural de Camarones (CaBN) mostraron mayor peso de valva que aquellos procedentes de los otros bancos naturales. Estos cultivos, CaCE y CoCM, se encuentran ubicados en la Bahía Camarones y en el golfo San Jorge respectivamente, zonas de gran movimiento de aguas y, como se observó en la tabla 2.2 del capítulo 2, estos sitios presentan mayores valores de clorofila, sobre todo el golfo San Jorge. Los mejillones en cultivo suspendido y los de los bancos naturales intermareales están expuestos a diferentes condiciones de crecimiento debido a las diferencias en la exposición al aire, la acción de las olas, la temperatura, la disponibilidad de alimentos, las corrientes, etc. (Cubillo *et al.* 2012b). Asimismo, las aguas de la corriente de Malvinas influyen en la plataforma patagónica e impactan en los ecosistemas regionales (Piola *et al.* 2010); la evidencia más obvia de este bombeo de nutrientes es el alto nivel de actividad biológica que se encuentra en la región de la Patagonia (Matano *et al.* 2010). Los cultivos en *longline*, como se explicó en la introducción general, consisten en cuerdas suspendidas a cierta profundidad, donde los mejillones están sumergidos filtrando alimento todo el tiempo. Así, estos mejillones cuentan con un suministro de alimento constante, logrando que su desarrollo sea mayor en comparación con mejillones procedentes de bancos naturales intermareales, donde además de los periodos de desecación y falta de alimento también hay depredación. Existen estudios que han registrado un crecimiento más rápido y una mejor condición fisiológica de los mejillones y otros filtradores intermareales en lugares de alta circulación de masas de agua en comparación con zonas refugiadas (Dahlhoff y Menge 1996; Leichter y Witman 1997; Robles y Robb 1993; Sanford y Menge 2001). Las fuerzas hidrodinámicas en los mejillones pueden aumentar las demandas de producción de biso o en el espesor de la valva (Steffani y Branch 2003), reduciendo la energía disponible

para el crecimiento. Por ejemplo, Raubenheimer y Cook (1990) informaron un mayor grosor de valva para *M. galloprovincialis* submareal sometido a una alta acción de ola en comparación con poblaciones en áreas protegidas, y concluyeron que cualquier beneficio de crecimiento acumulado en hábitats expuestos puede canalizarse hacia un espesor de valva cada vez mayor en lugar de la longitud. También en zonas expuestas al oleaje, Akester y Martel (2000) observaron que adultos y juveniles de *M. trossulus* exhibían una menor relación entre el alto y el grosor de la valva, además de valvas más gruesas, dientes de la charnela más altos y robustos y ligamentos más gruesos, en comparación con mejillones de zonas protegidas. Por otro lado, en los extremos de un gradiente de exposición al oleaje (en sitios protegidos y sitios extremadamente expuestos), Steffani y Branch (2003) encontraron que en mejillones de tamaño comparable las valvas eran más gruesas (más pesadas) en comparación con sitios moderadamente expuestos, en donde los mejillones presentaron valvas más delgadas (más livianas). En el trabajo realizado por Moschino *et al.* (2015) sobre *M. galloprovincialis*, además de observar variaciones en la forma y el grosor de la valva entre tres sitios con condiciones hidrodinámicas diferentes, observaron una compensación entre la protección (producción de valva) y el crecimiento (peso de pulpa) a lo largo del gradiente de la marea. Los autores sugieren que sitios con movimiento de mareas, o con alto tráfico marino pueden tener efectos negativos en el desarrollo de la pulpa, ya que los mejillones allí situados asignarían más energía al desarrollo de la valva que al crecimiento en carne (Moschino *et al.* 2015). Por el contrario, en esta tesis no se observó tal compensación, sino que el peso de la valva fue mayor en los cultivos en comparación con los bancos naturales, por lo que los mejillones de los cultivos no estarían perdiendo calidad (respecto del peso de la pulpa). Por otro lado, los mejillones del banco natural de Camarones, presentan altos valores de peso de valva pero bajos valores en el peso de la pulpa, lo que resulta en un mejillón de baja calidad.

Las diferencias en el peso de la valva de los mejillones de longitud similar pueden explicarse en gran medida en términos de edad, los individuos más viejos y de crecimiento más lento tienen valvas comparativamente más pesadas que sus contrapartes más jóvenes y de

crecimiento más rápido (Seed 1980). Sin embargo, en esta tesis no se hicieron cálculos de crecimiento, y además no se calcularon las edades de los individuos muestreados para corroborar si las diferencias se deben a su edad o a las diferentes condiciones hidrodinámicas de cada sitio.

El índice de condición, que relaciona el peso de la carne con el peso total o el peso de la valva, es una medida importante del estado fisiológico de los mejillones y la asignación relativa de los recursos al crecimiento del tejido o la valva (Raubenheimer y Cook 1990; Seed y Suchanek 1992). En este capítulo se compararon los índices de condición y el rendimiento en carne de mejillones de bancos naturales y cultivos procedentes de tres localidades de la provincia de Chubut. Los índices de condición calculados en este capítulo muestran una estrecha relación con el hábitat: en líneas generales dentro de cada localidad los índices de condición fueron mayores para los cultivos que para los bancos naturales. En el Golfo San Jorge, donde se ubican los cultivos de Comodoro, Colombo *et al.* (2016) observaron que los mejillones de los bancos naturales tuvieron un menor contenido relativo de carne y fueron los que presentaron mayor contenido de humedad. Estos autores concluyen que las diferencias observadas entre los mejillones de banco natural y cultivo se deberían al hábitat que ocupan, el cual determina diferencias en la calidad y cantidad de alimentos y diferencias en la energía destinada a mantenimiento. En lo que respecta a esta tesis, el IC1 para el cultivo de ACC (CoCM) de Comodoro fue el único que mostró un valor más bajo en comparación con el banco natural (CoBN) y el cultivo de la escuela (CoCE). El largo total al cubo en el IC1 puede usarse como un estimador del volumen, y los mejillones del cultivo CoCM presentaron mayores volúmenes, y esto puede deberse a que en comparación con el cultivo de la escuela (CoCE), el cultivo de la Agencia Comodoro Conocimiento (CoCM) tuvo un mejor mantenimiento de las líneas, haciendo los desdobles correspondientes, generando líneas de menor densidad. El desdoble en los cultivos de mejillón reduce la competencia por el alimento, favoreciendo un mejor crecimiento y engorde (Ceccherelli y Barboni 1983). Respecto de la comparación entre el cultivo CoCM y el banco natural CoBN, el menor IC1 para el cultivo en este caso podría deberse a una mayor

disponibilidad de espacio tridimensional para el crecimiento en la columna de agua experimentada por el cultivo en comparación con la disponibilidad de espacio bidimensional en los intermareales (De la Torre *et al.* 2007). Los índices de condición descritos en este capítulo pueden considerarse solo para el período específico de muestreo, ya que existe variabilidad según el estadio reproductivo o incluso según el año de muestreo debido a las condiciones climáticas. La principal diferencia en los índices de condición entre los hábitat aquí estudiados probablemente se deba a las fluctuaciones tanto en la concentración como en la calidad del alimento entre hábitats (Labarta *et al.* 1997; Peterson y Black 1988). Existen trabajos que muestran que tanto la disponibilidad de alimento como la exposición al aire en los individuos intermareales pueden ejercer una profunda influencia en la fisiología y el crecimiento en mejillones (Babarro *et al.* 2000; Bayne *et al.* 1987). Labarta *et al.* (1997) compararon tasas de crecimiento entre mejillones del intermareal y de líneas de cultivo en Galicia, España. Los autores observaron que en condiciones estables de laboratorio los mejillones de cultivo presentaron mejores índices fisiológicos, resultando en un mayor margen de crecimiento que los mejillones procedentes de intermareales. Según observaciones de Stephane Sorroche (maricultor) el mejillón de criadero tiene mejores y más homogéneos rindes que los mejillones de banco natural en Camarones, además de que tienen doble desove, uno en enero y otro en mayo. Por lo tanto, los resultados expuestos en este capítulo, donde se observó que los mejillones procedentes de cultivos tienen mayores índices de condición, suman evidencia corroborada al conocimiento empírico, de que los mejillones en cultivos submareales presentan mejores condiciones para el crecimiento, tanto de pulpa como de valva con respecto a los intermareales. Así, la influencia de los factores macroambientales (como las variaciones inter - submareales) hace que los mejillones asignen energía al crecimiento tanto en sus valvas como en su pulpa (Fuentes *et al.* 2000; Gascoigne *et al.* 2005; Mueller 1996; Sénéchal *et al.* 2008). Cubillo *et al.* (2012a) observaron variación en la morfología de la valva de los mejillones relacionada con el crecimiento, encontrando cambios graduales en sus proporciones relativas a medida que aumentan su tamaño. Los autores destacan, desde una

perspectiva fisiológica, que estos cambios pueden asociarse con el mantenimiento de proporciones óptimas (Banavar *et al.* 1999) o pueden reflejar una respuesta adaptativa a los cambios en las condiciones ambientales (Akester y Martel 2000; Reimer y Tedengren 1996; Seed 1980; Seed y Suchanek 1992; Steffani y Branch 2003).

Respecto de las densidades, Kirk *et al.* (2007) observaron que la densidad y la morfología diferían significativamente entre los mejillones de cultivo y los del intermareal, siendo las densidades de los cultivos considerablemente más altas. Asimismo, existen evidencias de que las altas densidades de las líneas de cultivo tienen influencia negativa sobre el crecimiento de los mejillones (Cubillo *et al.* 2012a). En esta tesis no se compararon las densidades de los bancos naturales con las de los cultivos, ya que el muestreo en los bancos naturales consistió en cuadrantes de 25 cm² y en los cultivos en *longlines* el muestreo consistió en extraer todos los mejillones de los primeros 25 cm de las líneas. Dentro de cada hábitat, no se encontraron diferencias significativas, salvo entre los bancos naturales y el cultivo de Riacho, lo cual se explica dado que las camas de cultivo en el momento del muestreo estaban casi abandonadas, con poco mantenimiento y, de hecho, con poco asentamiento de mejillones.

Queda pendiente para futuros trabajos un registro mensual en los índices de condición durante al menos dos años, para poder evaluar de esta manera la variabilidad estacional de los mismos. A su vez, sería óptimo para un estudio de este tipo identificar los estadios de madurez sexual de los mejillones muestreados en cada momento a nivel histológico. Sin embargo, los resultados aquí expuestos destacan una mejor calidad de los mejillones de cultivo por sobre los mejillones de los bancos naturales intermareales. Sumando los resultados de este capítulo a los del capítulo 2, se intentará en el siguiente capítulo destacar o diferenciar al mejillón chubutense del mejillón importado desde Chile.

Capítulo 4: Uso de la variación de la forma de la valva del mejillón para distinguir entre el mejillón chubutense y el chileno

4.1 Introducción

En los golfos del Norte de la Patagonia Argentina varias especies de bivalvos tienen interés comercial y son la base de la pesquería artesanal patagónica (www.argentina.gob.ar/agroindustria 2018) que se sustenta a partir de bancos naturales. En particular con el mejillón (*Mytilus edulis*) se está fomentando el desarrollo de emprendimientos para su cultivo, ya que en otros países de Sudamérica es uno de los principales recursos pesqueros. Por ejemplo, en Chile el cultivo del mejillón *M. chilensis* (Hupe 1854), más conocido como “Chorito”, es un importante recurso ecológico y económico, presente a lo largo de toda la costa (Valladares *et al.* 2010). Basado en la morfología, en 1846 D'Orbigny describió al mejillón nativo del Atlántico como *M. platensis*; unos años más tarde, el mejillón nativo de la costa del Pacífico de Chile fue descrito por primera vez por Hupé (1854) como *M. chilensis*, diferenciándolo del anterior. Desde ese tiempo hasta la actualidad, con el avance de las técnicas moleculares, se han realizado varios estudios en donde se intentó dilucidar si realmente las especies del hemisferio sur son especies distintas (Astorga *et al.* 2018; Larraín *et al.* 2018; McDonald *et al.* 1991; Santaclara *et al.* 2006; Zbawicka *et al.* 2018) y, a su vez, si son nativas o invasoras. Recientemente, Zbawicka *et al.* (2018) realizaron estudios genéticos y concluyeron que *M. platensis* y *M. chilensis* son taxones nativos distintos en América del Sur, lo que indica que las historias evolutivas de los taxones del género *Mytilus* a lo largo de las costas del Atlántico y del Pacífico son diferentes. Los mejillones chubutenses utilizados en esta tesis, como se aclaró con anterioridad y, por los marcadores genéticos utilizados, pertenecen a la especie *M. edulis* sin poder determinar todavía si se corresponden con *M. edulis platensis*.

Más allá de las diferencias genéticas, en moluscos en general y mejillones en particular, los estudios de variación morfológica de sus valvas juegan un rol importante en muchos campos como taxonomía, filogenética, evolución, ecología de la bioinvasión y acuicultura (Gardner y Thompson 2009; Gardner 1995; Illesca *et al.* 2018; Márquez *et al.* 2010; Seed y Suchanek 1992; Stirling y Okumuş 1994; Toro 1998). Además, las valvas corresponden a la parte más visible del cuerpo y presentan gran variabilidad, por lo que el uso de las variables

de forma para la identificación fenotípica de la población parece ser una buena alternativa para la discriminación entre grupos (Márquez *et al.* 2010; Rufino *et al.* 2013). Existen varios trabajos en donde se ha utilizado a la variación morfológica de la valva para la discriminación fenotípica de las poblaciones de bivalvos marinos con formas similares (Costa *et al.* 2008; Rufino *et al.* 2006) o entre poblaciones de la misma especie (Márquez *et al.* 2010; Palmer *et al.* 2004; Rufino *et al.* 2013). En el contexto de la identificación interdisciplinaria de poblaciones, el análisis morfométrico proporciona información sobre poblaciones fenotípicas (Cadrian *et al.* 2014), esto es, grupos de individuos con tasas de crecimiento, mortalidad y reproducción similares (Ihssen *et al.* 1981), que se explotan en un área específica. Estas poblaciones pueden definirse como poblaciones locales adaptadas a un entorno particular, diferentes genéticamente de otras como consecuencia de esta adaptación (MacLean y Evans 1981). Así, distinguir entre poblaciones fenotípicas desempeña un papel importante en la definición de medidas de manejo para el recurso en cuestión, a diferentes escalas geográficas (dentro del país y entre países), pero también permitiría hacer una etiqueta comercial con las denominaciones de origen de las capturas (Márquez *et al.* 2017b). La diferenciación de los productos alimenticios por sus cualidades particulares, como su extracción, producción y características ambientales es una herramienta útil para detectar y evitar la sustitución deliberada, no intencional de diferentes especies y para reforzar las normas de etiquetado (Fernández-Tajes *et al.* 2010).

El mejillón puede comercializarse vivo, fresco (media cáscara o pulpa), congelado (entero, media cáscara, pulpa cocida o cruda) o con valor agregado (ahumado, pulpa enlatada, sopas, escabeches, empanados, etc.) (www.argentina.gob.ar/agroindustria 2018). Según César Gentile (coordinador de la Red de Fortalecimiento para la Maricultura Costera Patagónica, comunicación personal) el mejillón fresco Argentino sería el producto que podría competir con el mejillón importado de Chile. Sin embargo, las provincias patagónicas donde se produce y/o extrae mejillón para el comercio en fresco, no cuentan con la infraestructura y/o logística adecuada para hacer llegar su producto a Buenos Aires y competir con el mejillón chileno, el cual es importado a muy bajo costo. Por tal motivo, el

mejillón que se produce en la provincia de Chubut, en líneas generales, se distribuye localmente (César Gentile, comunicación personal). Chile es en la actualidad el principal país exportador de mejillón del mundo y el 90% de la producción proviene de la isla de Chiloé (www.AmiChile.com 2019). En el año 2018 se importaron en Argentina desde Chile 701 toneladas de mariscos en general, de las cuales 402 toneladas fueron de mejillón (SENASA 2018). La coexistencia del mejillón chileno y el argentino en el mercado proporciona un modelo óptimo para conocer el origen de las capturas y plasmar esta información en el correcto etiquetado del producto, lo que permitiría a la industria seguir la trazabilidad del mismo y así aumentar su valor agregado o fomentar el consumo nacional. Para satisfacer las demandas actuales de la cadena global de comercialización, un buen sistema de trazabilidad del producto acuícola debe ser capaz de identificar a las especies y su origen geográfico y distinguir entre capturas silvestres o de cultivo (FAO 2018). Para esto, es necesaria una base científica eficaz, para que el sistema de trazabilidad pueda realizar un seguimiento fiable desde el punto de captura hasta el plato del consumidor (FAO 2018).

Con los avances en el análisis de imágenes y en los análisis estadísticos multivariados, el método más utilizado para los estudios de la variación fenotípica (forma y tamaño) es la morfometría geométrica (Cadrin *et al.* 2014). Así, el objetivo principal de este capítulo fue distinguir, por la forma de la valva, al mejillón chubutense procedente de cultivo del mejillón importado desde Chile.

4.2 Materiales y Métodos

El protocolo de digitalización para la valva derecha de las muestras procedentes de Chile fue el mismo que el descrito en el capítulo de metodología general para las valvas de las tres localidades de la provincia de Chubut (de ahora en adelante Argentina). Las valvas chilenas provienen de seis importadores de Chile y corresponden todas a cultivos en *longlines* (de ahora en adelante Chile). Las mismas fueron colectadas y enviadas por el Lic. Luis Filun, director del departamento de Acuicultura y Recursos Agroalimentarios de la Universidad de Los Lagos (Chile) mediante un convenio de colaboración. Se compararon las

valvas entre los países (Argentina, Chile) y entre las localidades: los cultivos de la provincia de Chubut con los mejillones provenientes de los cultivos de Chile, desde Puerto Montt a Chiloé: Huelmo y Caicaen (Norte) y Yutui, Chonchi, Curanué, Quinchet (Sur) (figura 4.1).

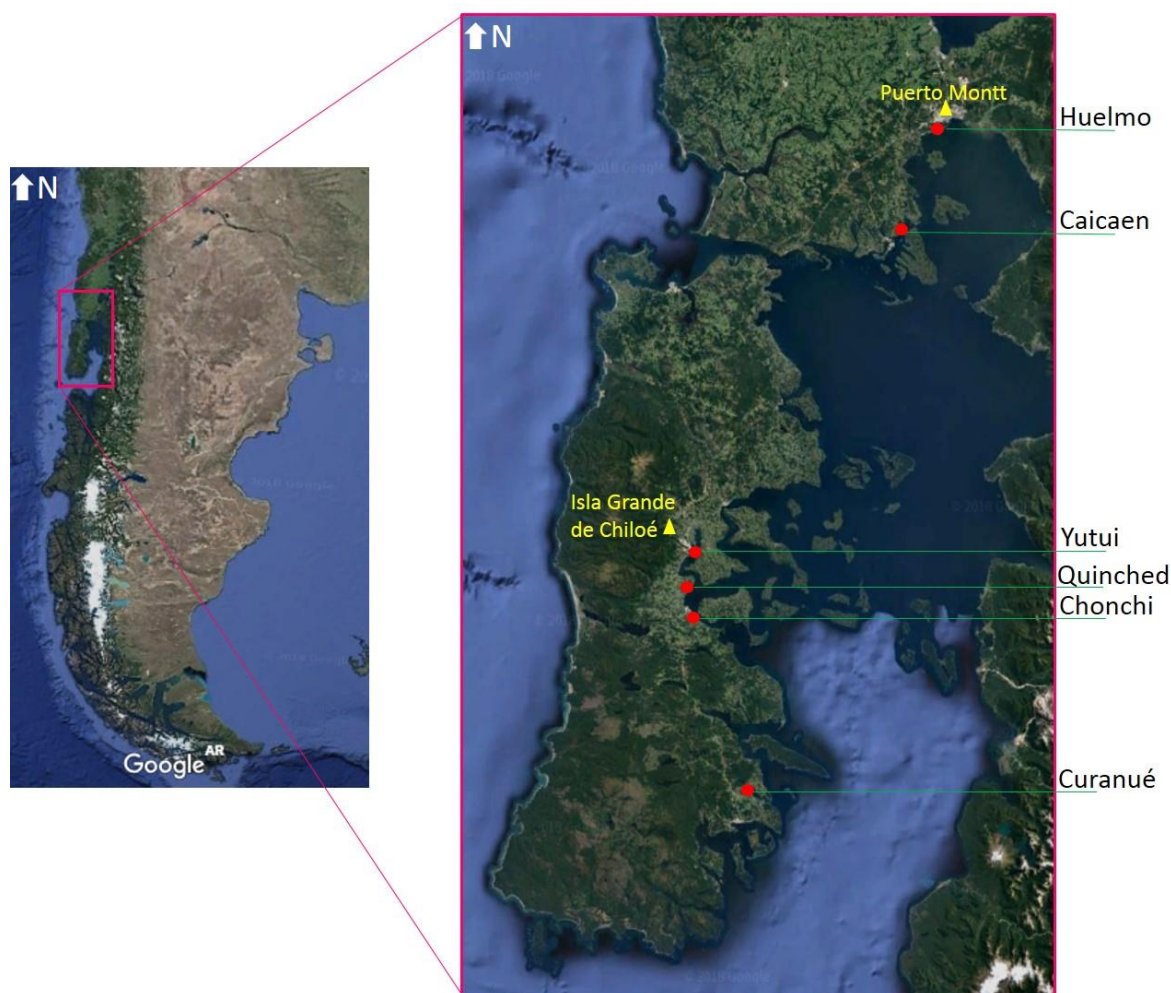


Figura 4.1 Mapa con las ubicaciones de los cultivos de donde provienen las muestras de Chile.

En la figura 4.2 se muestran fotos de las valvas típicas (consenso) de las localidades analizadas. Para el análisis de los datos se siguió el mismo protocolo empleado en el capítulo 1, se utilizaron las coordenadas de Procrustes alineadas como variables de forma. Primero se evaluó la alometría mediante la regresión multivariante entre el *centroid size* (variable independiente) y las coordenadas de Procrustes (variable dependiente), de los cultivos de ambos países, agrupadas según localidad (*pooled within* localidad). Se realizó una prueba

de permutación con 10.000 repeticiones para evaluar la independencia entre las variables de forma y tamaño (Bookstein 1991; Zelditch *et al.* 2004). Se utilizaron los residuales de la matriz de covarianza como variables de forma libres de alometría para evaluar la hipótesis de modularidad planteada en el capítulo 1: módulo interno / módulo externo. Se pusieron a prueba las hipótesis de modularidad por separado para las muestras procedentes de Argentina y Chile ya que las mismas pueden ser especie-específica. Para estudiar la magnitud y la dirección de la variación de la forma de la valva de cada país, se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), en el programa computacional MorphoJ versión 1.06d (Klingenberg 2011). Se realizó un esquema utilizando los *wireframe* o siluetas del PCA con un factor de escala exagerado (0.1) para visualizar las diferencias en forma de una manera más sencilla.

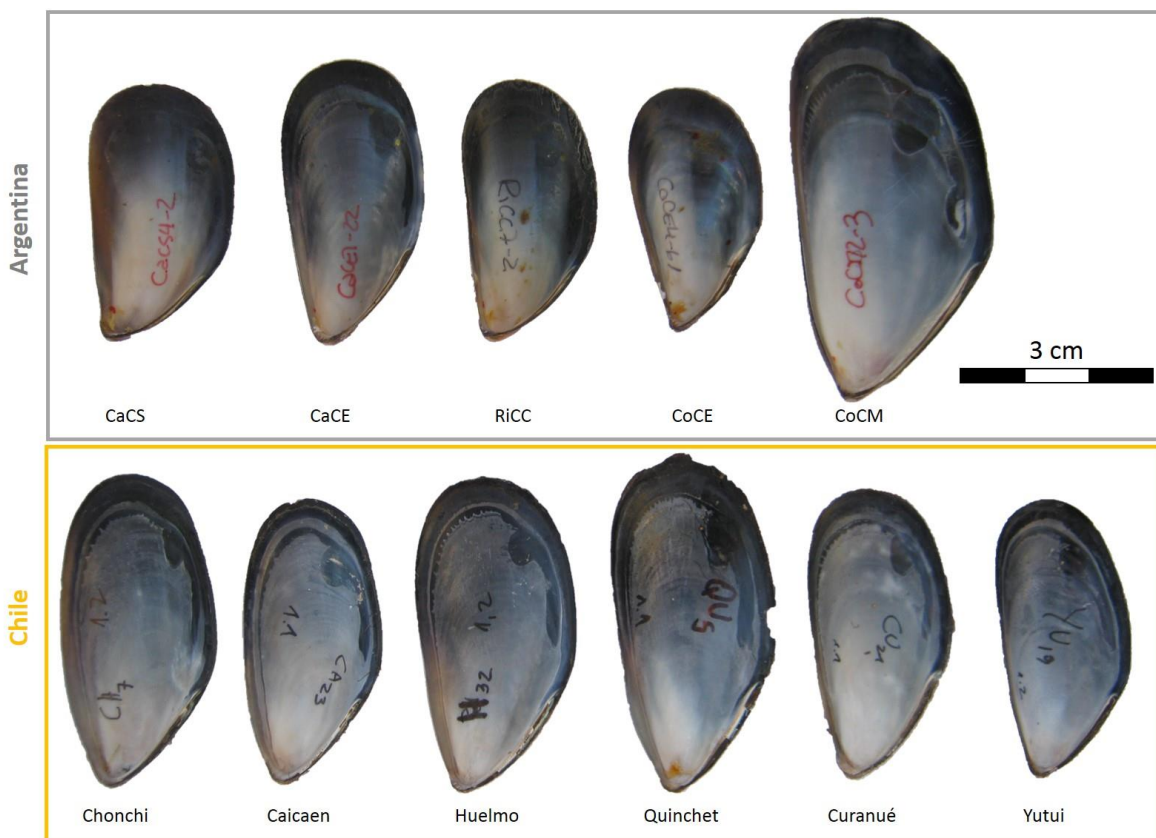


Figura 4.2 Foto de la valva derecha para cada una de las muestras de cultivo. RiCC: Riacho cultivo en camas, CaCS: Camarones cultivo S. Sorroche, CaCE: Camarones cultivo escuela, CoCM: Cultivo Agencia Comodoro Conocimiento (ACC), CoCE: Comodoro cultivo escuela. Las valvas de Chile se presentan con el nombre del lugar de donde provienen.

Por otro lado, para determinar el grado de similitud en la forma media de la valva entre los distintos grupos se realizó un análisis de conglomerado jerárquico, sobre la base de distancias de Mahalanobis, con una extensión para el caso multivariado del método de comparaciones múltiples con inferencia basadas en 1.000 permutaciones (Márquez *et al.* 2010; Márquez y Van Der Molen 2011; Valdano y Di Rienzo 2007), utilizando el *software* Infostat (Di Rienzo *et al.* 2012). Mediante un Análisis Discriminante se puso a prueba la diferencia de medias entre los países, con una prueba de T^2 de Hotelling con inferencia basadas en permutaciones (1.000 repeticiones). Por último, se estimó la probabilidad de un error en la clasificación en los diferentes grupos mediante el cálculo de las tasas de asignación correcta a los grupos determinados *a priori*, a partir del uso de una función discriminante (Balzarini *et al.* 2008).

4.3 Resultados

La regresión multivariada entre forma y tamaño fue significativa ($P < 0,0001$) y representó el 4,84% del total de la variación de la forma. En la figura 4.3 se observa que los mejillones de Argentina tienen mayor dispersión en el tamaño y existe una separación con respecto a las formas con los individuos de Chile. Con el fin de eliminar cualquier efecto de la alometría dentro de cada grupo se continuaron los análisis a partir de los residuales de la regresión.

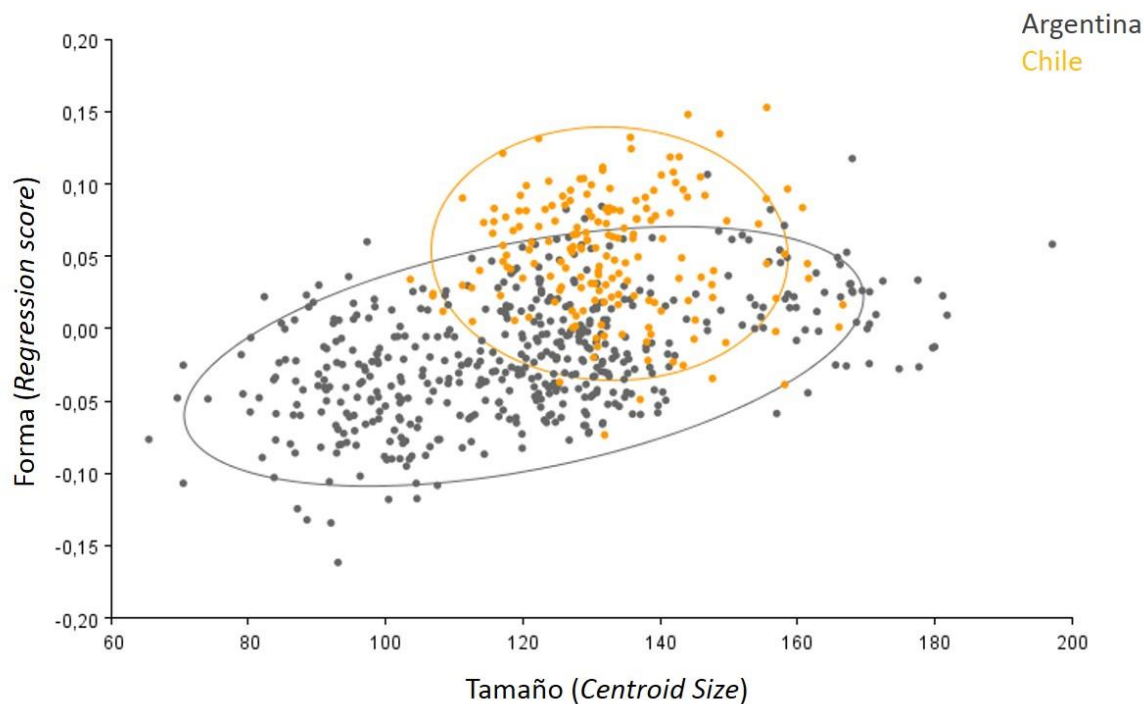


Figura 4.3 Regresión entre forma (*Regression Score*) y tamaño (*Centroid Size*), agrupadas por país. Las elipses de predicción representan un intervalo de confianza del 90%.

En el test de modularidad planteado dentro de Argentina, la hipótesis planteada *a priori* obtuvo el menor coeficiente RV (0,30), coincidiendo con los resultados del capítulo 1 (figura 4.4a). Sin embargo, dentro de Chile el test de modularidad resultó en una hipótesis de modularidad distinta (figura 4.4b). Por lo tanto, al no coincidir las hipótesis, la comparación en forma entre ambos países no se puede realizar en el contexto de modularidad, y de esta manera se continuaron los análisis utilizando solo la configuración externa de *landmarks*, debido a que, como se observó en el capítulo 2, es la que mejor clasifica las distintas localidades dentro de Chubut.

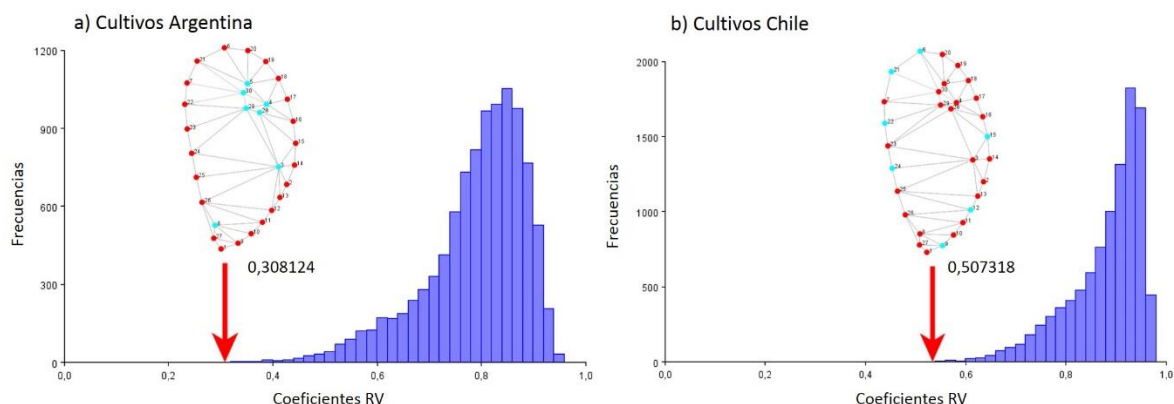


Figura 4.4 Histograma de distribución de los coeficientes RV para todas las particiones evaluadas entre a) los cultivos de Argentina, y b) los cultivos de Chile. La flecha roja indica el coeficiente más bajo.

En los diagramas de dispersión de los cuatro primeros componentes principales (figura 4.5) se muestran las variaciones de la forma externa de la valva libre de alometría, que representaron el 86,31% de la variación total; los otros PC no se tuvieron en cuenta porque su contribución en la explicación de la varianza total fue inferior al 5% (Zelditch *et al.* 2004). Si bien el PCA no representa una prueba estadística en cuanto a la diferenciación entre los países, en el morfoespacio se observa una tendencia a la separación entre estos, principalmente a lo largo del PC1 (figura 4.5).

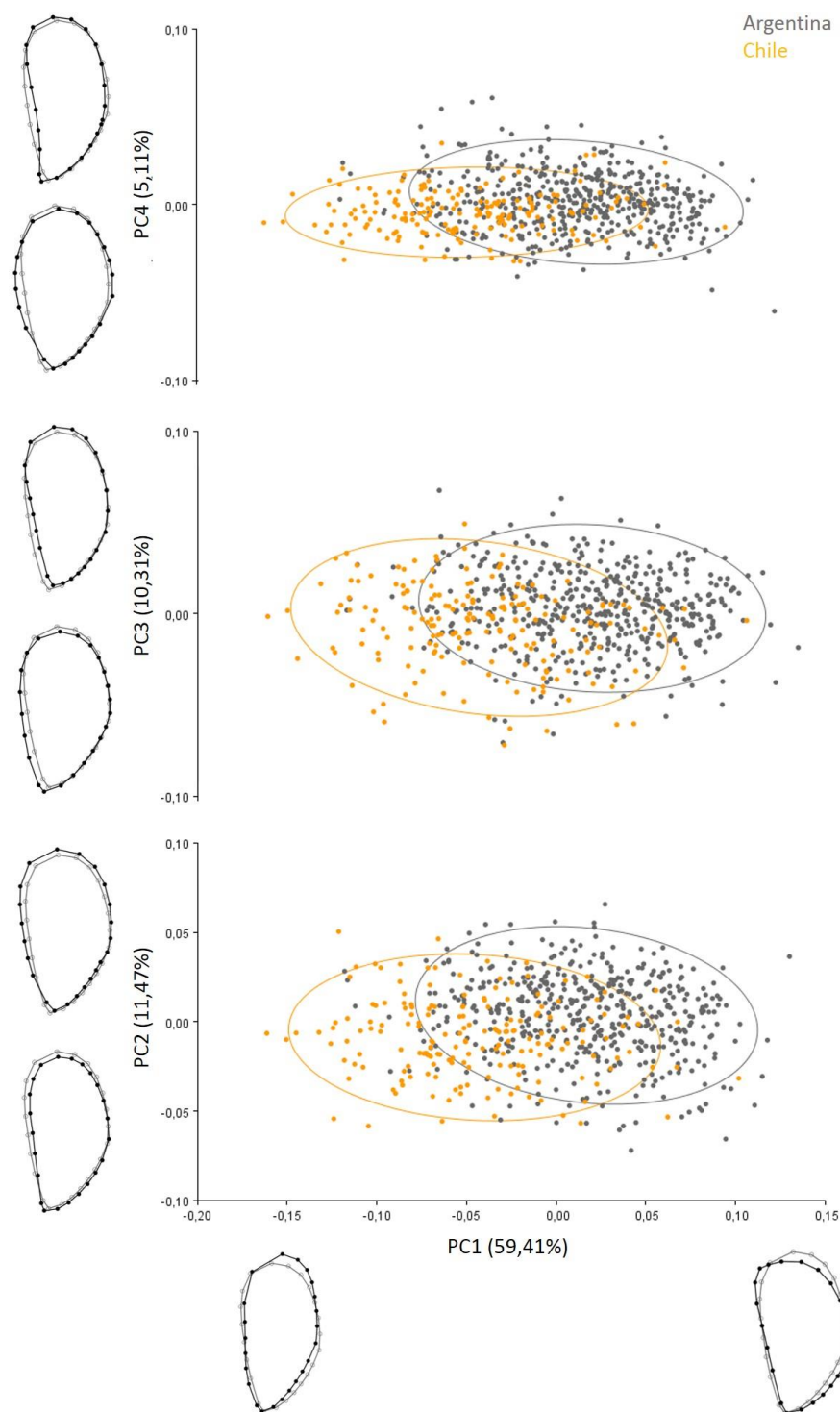


Figura 4.5 Gráfico de dispersión para los primeros cuatro componentes principales (PC), entre paréntesis se muestran los porcentajes de varianza explicada por cada PC. Las siluetas o *wireframes* indican los extremos del cambio en la forma de la configuración externa (en negro la forma objetivo y en gris el consenso). Se utilizó un factor de escala $\pm 0,15$ para el PC1 y $\pm 0,1$ para el PC2 el PC3 y el PC4, para representar los cambios en forma. Las elipses de predicción, representan un intervalo de confianza del 90%.

En el PC1 (59,41%) se observan hacia los valores negativos individuos con valvas elongadas, con una expansión en la zona posterior y un retraimiento en la zona dorsal-anterior (ligamento). Hacia los valores positivos de este eje de variación las valvas se expanden en sentido posteroventral y anterodorsal, es decir la variación contrapuesta a la descripta anteriormente. El PC2 explicó el 11,47% del total de la variación de la forma, y se relacionó en los valores positivos con una expansión en la zona posterior y un leve retraimiento en el umbo. Mientras que en los valores negativos se observa un retraimiento en la zona ventral-posterior y un leve movimiento del umbo hacia la zona dorsal. En los valores negativos del PC3 (10,31%) se observan valvas con una expansión en la zona ventral y del umbo y un leve retraimiento en la zona posterior, mientras que hacia los valores positivos las valvas son más angostas. Por último el PC4, que explicó el 5,11% de la variación total, muestra en los valores negativos valvas con el umbo retraído y una expansión dorso-ventral y en los valores positivos valvas con el umbo expandido hacia el lado ventral y un leve retraimiento dorso-ventral. En la figura 4.6 se resume la variación en la forma expresada en los cuatro primeros ejes de variación mediante un gráfico de siluetas (*wireframe*). Se utilizó un factor de escala de ± 0.1 para todos los ejes, con el objeto de poder observar levemente magnificadas las direcciones del cambio en la forma.

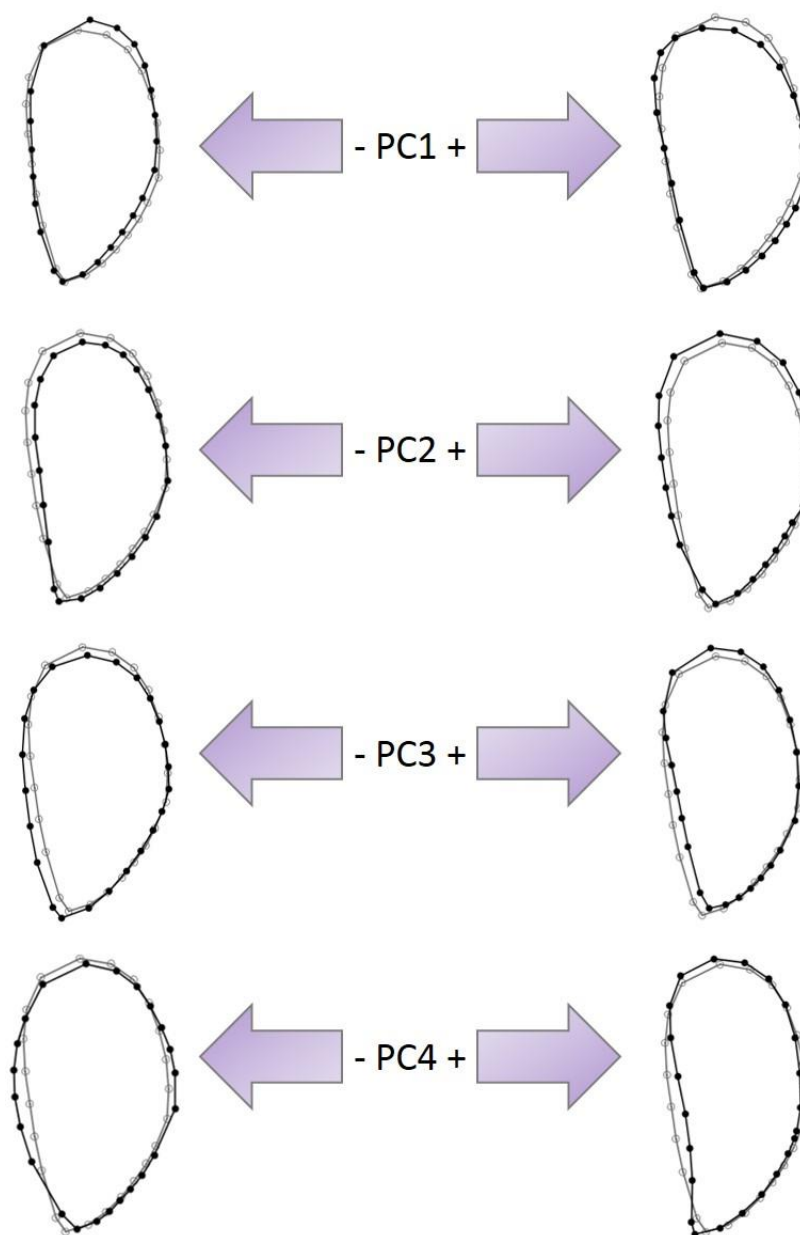


Figura 4.6 Wireframe (factor de escala de ± 0.1) correspondientes a los 4 primeros PCs. En gris se muestra la configuración consenso y en negro la forma objetivo.

En el conglomerado construido a partir de las variables de forma (PCs) se observa el agrupamiento de los sitios de cultivo según las localidades de los países, donde se evidencian dos grandes grupos: Argentina y Chile, más allá de la forma característica de la valva significativamente distinta dentro de estos dos grandes grupos (figura 4.7). En Argentina, los únicos cultivos que no presentan diferencias significativas en su forma fueron los de Camarones (CaCS/CaCE). Por otro lado, en el grupo Chile, el único que se diferencia

significativamente del resto es Curanué. La mayor variabilidad se observa dentro de las localidades de Argentina.

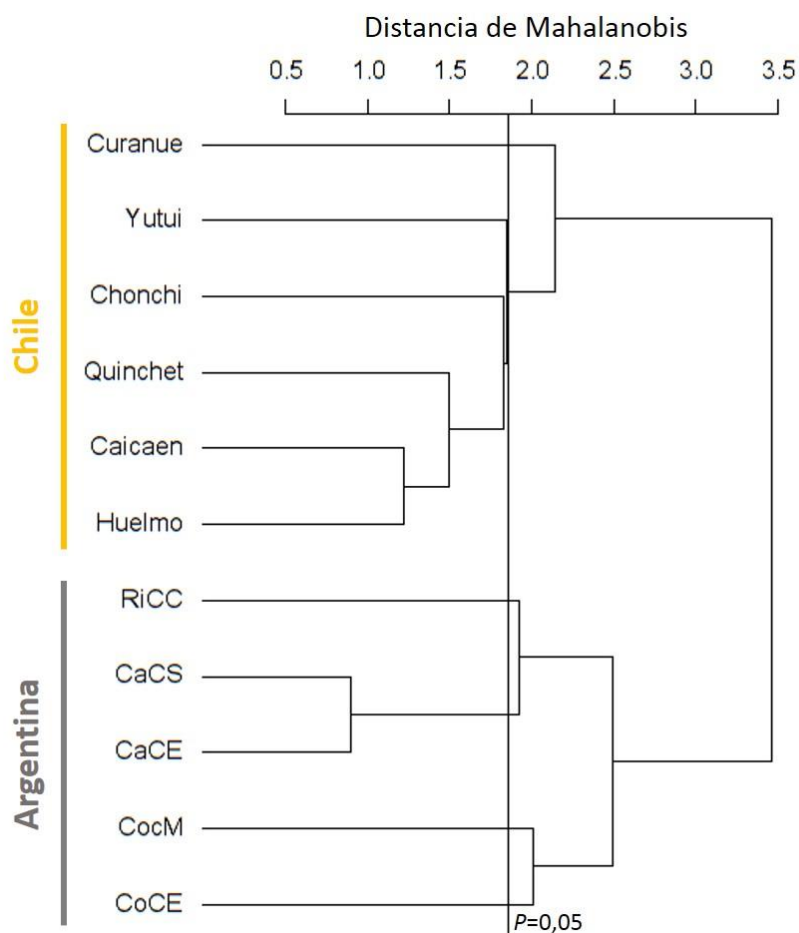


Figura 4.7 Conglomerado Jerárquico UPGMA sobre las distancias de Mahalanobis que ilustra las relaciones entre la forma media de las valvas de los distintos cultivos. La línea vertical corresponde al criterio de corte ($P= 0,05$) obtenido a partir de la prueba MDGC, la cual determina la presencia de grupos estadísticamente distintos.

El análisis discriminante distinguió una forma de valva característica de Argentina y otra de Chile, ($T^2 = 1978$, $P < 0,0001$). La forma media de la valva del mejillón de Argentina, comparada con la de Chile, presenta una forma más globosa que se asocia a una expansión en la zona posteroventral, constricciones en parte posterior y en la zona anteroventral y por último una expansión en la zona anterodorsal correspondiente al ligamento (Figura 4.8).

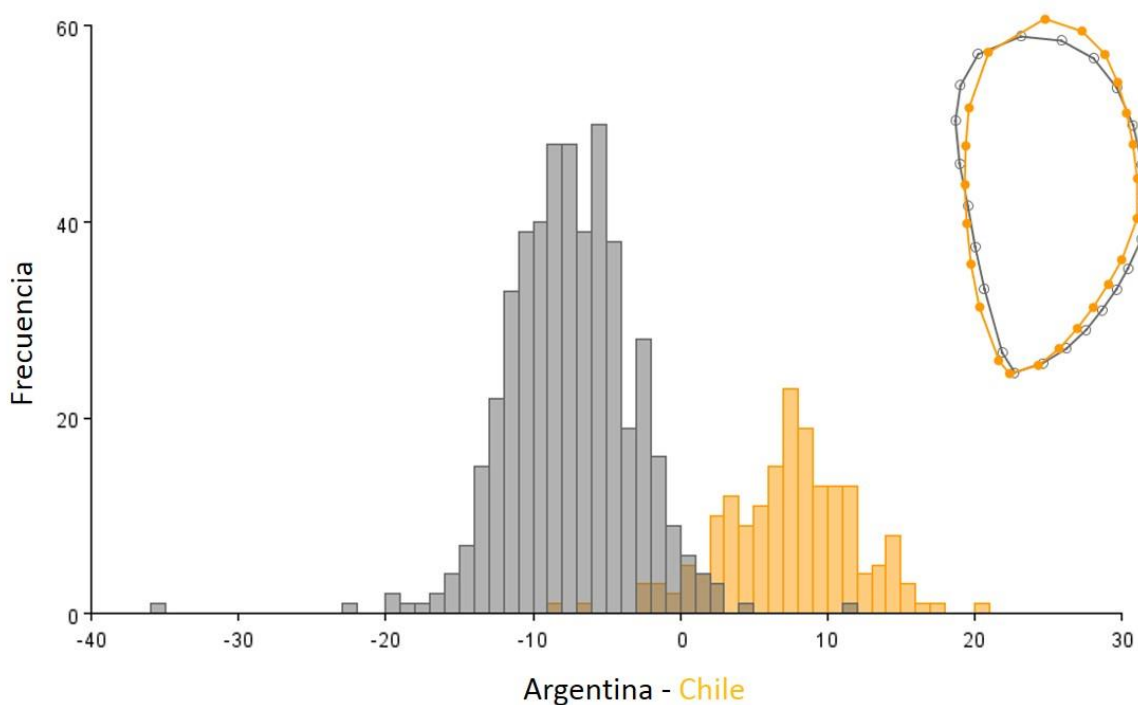


Figura 4.8 Histograma de Frecuencias - Análisis discriminante de las diferencias de forma entre Argentina y Chile. Las formas medias para cada grupo se muestran en un gráfico *wireframe* magnificadas las diferencias al doble.

La tabla de clasificación cruzada (Tabla 4.1a) muestra, en líneas generales, que la clasificación no es correcta principalmente entre los cultivos dentro de cada país, y que es baja la confusión entre un cultivo de Chile con uno de Argentina. Casi todos los sitios, menos el cultivo de Caicaen, tienen más del 50% de asignación correcta. Por ejemplo, el cultivo de Curanué presenta el porcentaje de asignación correcta más alto para Chile (86,67%), mientras que el cultivo de ACC (CoCM) presentó el mayor porcentaje dentro de Argentina (82,18%). Argentina tiene un porcentaje de asignación correcta entre sus cultivos de un 97,9%, mientras que el porcentaje de Chile es un poco menor (95,56%; Tabla 4.1b).

Tabla 4.1 Tabla de clasificación cruzada, a) entre todas las localidades, b) entre Argentina y Chile. Se muestra el número de observaciones correctamente clasificados en cada grupo y los porcentajes de asignación correcta.

a)	CaCE	CaCS	CoCE	CoCM	RiCC	Caicaen	Chonchi	Curanué	Huelmo	Quinchet	Yutui	Total	% Asignación correcta
CaCE	70	29	1	1	4	0	0	1	0	0	0	106	66,04
CaCS	20	63	0	1	6	0	2	0	0	0	1	93	67,74
CoCE	3	3	82	10	5	0	0	0	1	0	0	104	78,85
CoCM	4	2	5	83	6	0	0	0	0	1	0	101	82,18
RiCC	4	4	5	2	56	0	2	1	0	0	0	74	75,68
Caicaen	0	0	0	0	0	14	0	2	5	6	3	30	46,67
Chonchi	0	0	1	0	1	3	16	1	1	5	2	30	53,33
Curanué	0	0	0	1	0	1	1	26	0	1	0	30	86,67
Huelmo	1	0	0	0	0	2	3	3	18	1	2	30	60
Quinchet	0	0	0	0	0	5	1	1	5	15	3	30	50
Yutui	0	0	0	0	0	3	6	0	3	3	15	30	50
	102	101	94	98	78	28	31	35	33	32	26	658	

b)	Argentina	Chile	Total	% Asignación correcta
Argentina	468	10	478	97,91
Chile	8	172	180	95,56
Total	476	182	658	

4.4 Discusión

El análisis de la forma se considera especialmente importante para taxones de valor económico y ecológico como los mejillones del género *Mytilus* (Gosling 2003). Dado que permite la discriminación de formas de organismos de diferentes especies o de organismos de hábitats específicos y, además, brinda herramientas para la comprensión de los mecanismos subyacentes que conducen a la variación de las estructuras morfológicas (Telesca *et al.* 2018). Asimismo, esta técnica es de muy bajo costo comparada con otro tipo de técnicas, como por ejemplo las herramientas genéticas tradicionales (Illesca *et al.* 2018). Los resultados de este capítulo muestran claras diferencias morfométricas entre la forma de las valvas de mejillones provenientes de Argentina y Chile y de los diferentes cultivos dentro de cada país. Por lo tanto, queda de manifiesto la gran utilidad de una herramienta como la morfometría geométrica a la hora de distinguir entre poblaciones fenotípicas, dado que esta técnica permitió caracterizar, con alta resolución, cambios sutiles en la variación de la forma de la valva de los mejillones de las principales localidades de cultivo del extremo sur de Sudamérica.

En morfometría geométrica los módulos morfológicos se manifiestan como grupos o configuraciones de *landmarks* que están mínimamente correlacionados con otros grupos

similares. Vale recordar que si una subdivisión entre dos configuraciones coincide con los límites reales entre los módulos, las correlaciones entre los subconjuntos deben ser mínimas y se evidencian con bajos coeficientes RV (Klingenberg 2009). Los resultados obtenidos sobre el test de modularidad para los mejillones de Argentina y Chile no fueron consistentes con la hipótesis planteada *a priori*, de que el módulo interno (asociado a cicatrices de partes blandas) y el módulo externo (partes duras) son módulos morfológicos independientes. Sin embargo, cuando el test se hace por separado para Argentina y para Chile, en los cultivos de Argentina la hipótesis de modularidad planteada *a priori* obtiene el menor coeficiente RV, como se había observado en el capítulo 1. Por su parte, en los cultivos de Chile fue una hipótesis alternativa la que obtuvo el menor coeficiente RV; lo que significa que en *M. chilensis* la partición de un módulo interno y otro externo no sería la verdadera subdivisión de módulos. Este tipo de resultados abre futuras líneas de investigación respecto de la modularidad en diferentes especies de bivalvos. La modularidad ha sido estudiada utilizando datos morfológicos, y así han sido descriptos diferentes tipos de módulos (i.e de desarrollo, genéticos, funcionales y evolutivos, Klingenberg (2008); ver capítulo 1). El estudio de las relaciones entre estos diferentes tipos de módulos puede ser informativo sobre los procesos biológicos subyacentes (Breuker *et al.* 2006). Por lo tanto, sería de interés para la biología evolutiva poder responder al porqué de esta diferenciación en los módulos entre *M. chilensis* y *M. edulis*, así como conocer los mecanismos de desarrollo que generan la covariación de los rasgos observables para comprender su importancia evolutiva (Klingenberg 2008).

Las muestras procedentes de Chile corresponden al área que abarca desde Puerto Montt hasta el sur de Chiloé, zona donde predomina la especie *M. chilensis* (Illesca *et al.* 2018). Asimismo, sobre las muestras argentinas se realizaron análisis moleculares de cuyos resultados se desprende que la especie predominante es *M. edulis* (Vanina Villanova, resultados no publicados). Como muestran los resultados de este capítulo se evidencia una clara diferenciación morfológica interespecífica entre *M. edulis* y *M. chilensis*. El mejillón chileno presentó una valva con forma de gota, mientras que el mejillón chubutense mostró

una valva más globosa. Valladares *et al.* (2010) utilizando una configuración de *landmarks* con puntos externos e internos encontraron diferencias en la forma de la valva entre mejillones cultivados y de bancos naturales, y a lo largo de un gradiente latitudinal en la costa de Chile, descubriendo que los mejillones del sur son más elongados y cóncavos que los del norte, coincidiendo con los resultados obtenidos en este capítulo. Más recientemente, Illesca *et al.* (2018), utilizando una configuración de *landmarks* similar a la descrita en Valladares *et al.* (2010), analizaron diferencias en la forma de la valva entre tres especies presentes en las costas chilenas (el mejillón introducido *M. galloprovincialis* al norte, el mejillón nativo del Pacífico sur *M. chilensis* en la zona de Chiloé, y el mejillón nativo del Atlántico sur *M. edulis* al sur). Los autores observaron que *M. edulis* fue el más distinto, mostrando una forma de valva más alargada (larga y delgada), en comparación con las otras especies, contrario a los resultados obtenidos en este capítulo. Tal vez esta diferencia se deba a que las muestras utilizadas para el análisis de este capítulo corresponden a muestras procedentes de cultivos, mientras que el muestreo de Illesca *et al.* (2018) corresponde a bancos naturales. A partir de los resultados de este capítulo, podemos expandir la generalización de la diferenciación entre *M. edulis* y *M. chilensis* también a los individuos de cultivo.

En Chile la miticultura es la segunda industria más importante del país (www.AmiChile.com 2019), esto lleva a que la producción científica referida a diferentes aspectos de la biología del mejillón sea muy abundante, incluidos estudios referidos a la forma de la valva. En Argentina, por el contrario, existen varios trabajos sobre la biología y ecología del mejillón en general (Bala 1989; Penchaszadeh 1974; Zaixso 2015), pero son muy escasos los estudios morfométricos. Savoya *et al.* (2015), mediante análisis elíptico de Fourier, encontraron diferencias en la forma de la valva de mejillones actuales y de concheros utilizados por pueblos originarios (arqueológicos) en seis sitios a lo largo de la Patagonia Argentina, y concluyeron que el *Mytilus* moderno podría corresponderse a una especie introducida. Por otro lado, en el Capítulo 1 de su tesis doctoral Savoya (2011), utilizando morfometría clásica, muestra que los mejillones reconocidos como morfos *platensis* y *chilensis* son

morfométricamente diferentes, a lo largo de toda la costa del Atlántico Sudoccidental. Dada la falta de antecedentes de estudios morfométricos en el mejillón de la costa argentina, los resultados de esta tesis en general, y de este capítulo en particular, cobran total relevancia. Además, se sugiere el avance en estudios genéticos sobre el mejillón de la costa argentina para terminar de confirmar su estatus taxonómico.

Para que la gestión de un recurso pesquero sea eficiente es necesaria una buena articulación entre la biología y las acciones de manejo (Reiss *et al.* 2009). Los pescadores artesanales y miticultores argentinos tienen la iniciativa de diferenciar sus productos mediante el desarrollo de una marca, una firma original o certificaciones (CoFeCyT 2008). Quedó demostrado en este capítulo que el análisis de la forma de la valva es eficaz a la hora de distinguir el país de origen o la procedencia (ver Capítulo 2) del mejillón. Por lo tanto, la MG, podría utilizarse como herramienta complementaria y de bajo costo para desarrollar la denominación de origen del mejillón chubutense y de esta manera distinguirlo en el mercado. Los recursos pesqueros procedentes de esta provincia son productos de calidad, ya que las aguas donde se desarrollan (con clasificación “A” de SENASA) no se encuentran en cercanías de centros urbanos o dichos centros presentan tratamientos de efluentes industriales y cloacales. A su vez, se han aplicado medidas de mitigación en cuanto a la contaminación, como por ejemplo la aplicada por Prefectura Naval Argentina que desplazó la ruta de los petroleros a varias millas de la costa en 1998 (Ordenanza Marítima No 13/97, prefectura naval argentina) (Gil *et al.* 2019). Por lo tanto, sería crucial diseñar un conjunto de marcas que identifiquen y resalten los atributos sociales, ambientales y de calidad de los productos pesqueros argentinos (Márquez *et al.* 2017b). De esta manera se podrá lograr una dimensión significativa para el sector, ya que permitirá a la industria pesquera explorar nuevos mercados que hasta ahora han sido difíciles de alcanzar debido a la falta de una acreditación que les otorgue una etiqueta de calidad a sus productos (SENASA 2013).

Conclusiones

Los moluscos incluyen a varias especies con interés comercial, algunos son extraídos de su ambiente y otros cultivados. La provincia de Chubut cuenta con varias especies de molusco con interés y potencial pesquero. Ante la merma de los recursos extractivos, en la década de los '90 es que se comienza a experimentar con el cultivo de bivalvos, donde el mejillón fue la especie elegida por excelencia. En la actualidad existen en la provincia varios emprendimientos referidos a la maricultura, tanto privados como estatales, con la intención de incorporarlos en la matriz industrial; además de reflejar un incremento significativo en la producción total, se ha logrado una renovación del recurso natural. Sin embargo, más allá de la dedicación de los maricultores y del apoyo provincial en el interés de impulsar esta industria, la comercialización de la producción queda casi en su totalidad en un entorno local y a bajo costo, debido a la falta de una marca o denominación de origen que acredite el verdadero valor del producto. Por eso, durante el mes de marzo del 2019, el estado provincial de Chubut lanzó un plan estratégico de comercio exterior que apunta a desarrollar, potenciar y agregar valor a las diferentes producciones locales, lanzando un sello "Origen Chubut" para lograr la identidad de los productos que salen de la provincia. Los resultados obtenidos en esta tesis aportan información biológica de base para que se pueda desarrollar una marca registrada o denominación de origen del producto chubutense mejillón. La utilización de la morfometría geométrica es una herramienta recomendable a la hora de distinguir entre mejillones de diferentes procedencias, más allá de que sus diferencias sean sutiles.

Uno de los aportes innovadores de esta tesis fue presentado en el primer capítulo, en el cual se caracterizaron dos módulos morfológicos en la valva del mejillón chubutense (*M. edulis*). Uno interno que hace referencia a las cicatrices de los músculos y otro externo que delimita el contorno de la valva. Este descubrimiento plantea nuevos interrogantes respecto de la teoría de modularidad e integración morfológica en bivalvos, además de una oportunidad para revisar los trabajos existentes en donde se hayan aplicado configuraciones de *landmarks* que puedan estar enmascarando la presencia de módulos. A su vez, el hecho de que la hipótesis de modularidad planteada *a priori* (módulo

externo/interno) para el mejillón argentino no haya obtenido el mismo resultado que en el mejillón chileno (capítulo 4; *M. chilensis*) evidencia que la modularidad en *Mytilus* es una cuestión especie específica. Otro resultado destacable fue la presencia de mayores niveles de asimetría fluctuante (AF) en los mejillones procedentes de los bancos naturales, en comparación con los de cultivo. Este descubrimiento consolida la hipótesis de que la AF es una medida para detectar interrupciones en el desarrollo producidas por una fuente de estrés ambiental y contribuye a futuras investigaciones respecto de cómo afectan distintos estresores a la AF en bivalvos. Por último se describió con un gran nivel de detalle, el espacio de variación en forma de la valva del mejillón de las zonas productivas de la provincia de Chubut.

En el capítulo 2 quedó en evidencia la diferenciación en la forma de la valva a distintas escalas geográficas, ya sea entre los mejillones de los diferentes sitios, entre las diferentes localidades dentro del mismo hábitat y dentro de las localidades entre hábitats, en ambos módulos. El módulo externo presentó los mejores porcentajes de asignación a los grupos determinados, por lo tanto se sugiere su utilización a la hora de diseñar futuros trabajos de fiscalización y manejo en la pesquería del mejillón del Chubut.

Asimismo, los mejillones de cultivo se diferenciaron significativamente de los mejillones de los bancos naturales en cuanto a los diferentes índices de condición calculados en el capítulo 3, y obtuvieron los mayores valores, dato de importancia a la hora de distinguir al producto comercial.

Por último, además del resultado innovador respecto del test de modularidad en el capítulo 4 planteado en párrafos anteriores de esta sección, queda de manifiesto la diferenciación en la forma de la valva entre las especies *M. edulis* y *M. chilensis*. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta tesis, son un punto de partida que junto a los avances en otras disciplinas, pueden converger en un trabajo colaborativo con entidades gubernamentales y maricultores, con el objeto de lograr desarrollar una marca registrada o una denominación de origen del mejillón chubutense.

Bibliografía

A

- Acosta V, Prieto A, Lodeiros C (2006) Índice de condición de los mejillones *Perna perna* y *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) bajo un sistema suspendido de cultivo en la Ensenada de Turpialito, Golfo de Cariaco, Venezuela. *Zootecnia tropical* 24 (2):177-192
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian journal of zoology* 71 (1):5-16
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE (2013) A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix* 24 (1):7
- Akester RJ, Martel AL (2000) Shell shape, dysodont tooth morphology, and hinge-ligament thickness in the bay mussel *Mytilus trossulus* correlate with wave exposure. *Canadian journal of zoology* 78 (2):240-253
- Alunno-Bruscia M, Bourget E, Fréchette M (2001) Shell allometry and length-mass-density relationship for *Mytilus edulis* in an experimental food-regulated situation. *Marine ecology progress series* 219:177-188
- Amoroso RO, Gagliardini DA (2010) Inferring complex hydrographic processes using remote-sensed images: turbulent fluxes in the patagonian gulfs and implications for scallop metapopulation dynamics. *Journal of coastal research*:320-332
- Armbruster W, Schwaegerle K (1996) Causes of covariation of phenotypic traits among populations. *Journal of evolutionary biology* 9 (3):261-276
- Arranz K, Labarta U, Fernández-Reiriz MJ, Navarro E (2016) Allometric size-scaling of biometric growth parameters and metabolic and excretion rates. A comparative study of intertidal and subtidal populations of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Hydrobiologia* 772 (1):261-275
- Arrieche D, Licet B, García N, Lodeiros C, Prieto A (2002) Índice de condición, gonádico y de rendimiento del mejillón marrón *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae), del morro de Guarapo, Venezuela. *Interciencia* 27 (11):613-619
- Astorga MP, Cardenas L, Vargas J (2015) Phylogenetic approaches to delimit genetic lineages of the *Mytilus* complex of South America: how many species are there? *Journal of shellfish research* 34 (3):919-931
- Astorga MP, Vargas J, Valenzuela A, Molinet C, Marín SL (2018) Population genetic structure and differential selection in mussel *Mytilus chilensis*. *Aquaculture research* 49 (2):919-927

B

- Babarro JM, Fernández-Reiriz MJ, Labarta U (2000) Feeding behavior of seed mussel *Mytilus galloprovincialis*: environmental parameters and seed origin. *National shell fisheries association*
- Bala LO (1989) Biología y ecología del mejillón (*Mytilus edulis platensis*) en el golfo San José, provincia del Chubut. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo

- Balzarini M, Gonzalez L, Tablada E, Casanoves F, Di Rienzo J, Robledo C (2008) InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario Universidad Nacional de Córdoba, Editorial Brujas, Argentina
- Banavar JR, Maritan A, Rinaldo A (1999) Size and form in efficient transportation networks. *Nature* 399 (6732):130
- Baylac M, Villemant C, Simbolotti G (2003) Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biological journal of the linnean society* 80 (1):89-98
- Bayne B, Hawkins A, Navarro E (1987) Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *Journal of experimental marine biology ecology* 111 (1):1-22
- Bayne B, Salkeld P, Worrall C (1983) Reproductive effort and value in different populations of the marine mussel, *Mytilus edulis* L. *Oecologia* 59 (1):18-26
- Beadman H, Caldow R, Kaiser M, Willows R (2003) How to toughen up your mussels: using mussel shell morphological plasticity to reduce predation losses. *Marine biology* 142 (3):487-494
- Beardmore J (1960) Developmental stability in constant and fluctuating temperatures. *Heredity* 14 (3-4):411
- Bertness MD, Crain CM, Silliman BR, Bazterrica MC, Reyna MV, Hildago F, Farina JK (2006) The community structure of western Atlantic Patagonian rocky shores. *Ecological monographs* 76 (3):439-460
- Bertness MD, Leonard GH (1997) The role of positive interactions in communities: Lessons from intertidal habitats. *Ecology* 78 (7):1976-1989
- Bieler R, Mikkelsen PM, Giribet G (2013) Bivalvia—a discussion of known unknowns. *American Malacological Bulletin* 31 (1):123-134
- Bignon O, Baylac M, Vigne J-D, Eisenmann V (2005) Geometric morphometrics and the population diversity of Late Glacial horses in Western Europe (*Equus caballus arcelini*): phylogeographic and anthropological implications. *Journal of archaeological science* 32 (3):375-391
- Bookstein F (1991) Morphometric tools for landmark data. Melbourne, Sydney, Cambridge University Press, Cambridge, New York
- Bookstein FL (1982) Foundations of morphometrics. *Annual review of ecology and systematics* 13 (1):451-470
- Bookstein FL (1998) A hundred years of morphometrics. *Acta zoologica academiae scientiarum hungaricae* 44 (1-2):7-59
- Brenner M (2009) Site selection criteria and technical requirements for the offshore cultivation of blue mussels. Dissertation. Jacobs University Bremen, Bremen
- Breuker CJ, Debat V, Klingenberg CP (2006) Functional evo-devo. *Trends in ecology evolution* 21 (9):488-492
- Briones C, Guiñez R (2005) Asimetría bilateral de la forma de las valvas y posición espacial en matrices del chorito *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae). *Revista chilena de historia natural* 78 (1):3-14

- Briones C, Rivadeneira MM, Fernandez M, Guinez R (2014) Geographical variation of shell thickness in the mussel *Perumytilus purpuratus* along the Southeast Pacific coast. The biological bulletin 227 (3):221-231
- Brown JR, Hartwick EB (1988) Influences of temperature, salinity and available food upon suspended culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: II. Condition index and survival. Aquaculture 70 (3):253-267
- Brown R, Seed R, O'connor R (1976) A comparison of relative growth in Cerastoderma (= Cardium) edule, *Modiolus modiolus*, and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia). Journal of zoology 179 (3):297-315

C

- Cadrin SX, Friedland KD (1999) The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. Fisheries research 43 (1-3):129-139
- Cadrin SX, Karr LA, Mariani S (2014) Stock identification methods: an overview. En: Stock identification methods. Elsevier, pp 1-5
- Cadrin SXF (2000) Advances in morphometric identification of fishery stocks. Reviews in fish biology 10 (1):91-112
- Camacho AP, Labarta U, Beiras R (1995) Growth of mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis*) on cultivation rafts: influence of seed source, cultivation site and phytoplankton availability. Aquaculture 138 (1-4):349-362
- Cardini A (2016) Lost in the other half: improving accuracy in geometric morphometric analyses of one side of bilaterally symmetric structures. Systematic biology 65 (6):1096-1106
- Caro AU, Castilla JC (2004) Predator-inducible defences and local intrapopulation variability of the intertidal mussel *Semimytilus algosus* in central Chile. Marine ecology progress series 276:115-123
- Ceccherelli V, Barboni A (1983) Growth, survival and yield of *Mytilus galloprovincialis* L. on fixed suspended culture in a bay of the Po River Delta. Aquaculture 34 (1-2):101-114
- Christensen PB, Glud RN, Dalsgaard T, Gillespie P (2003) Impacts of longline mussel farming on oxygen and nitrogen dynamics and biological communities of coastal sediments. Aquaculture 218 (1-4):567-588
- Colombo J, Varisco M, Isola T, Crovetto C, Rost E, Risso S (2016) Composición química proximal y perfil de ácidos grasos del mejillón *Mytilus edulis* provenientes de cultivos y bancos naturales en el Golfo San Jorge, Argentina. Revista de biología marina y oceanografía 51 (2):293-299
- Connell SD (2001) Urban structures as marine habitats: an experimental comparison of the composition and abundance of subtidal epibiota among pilings, pontoons and rocky reefs. Marine environmental research 52 (2):115-125
- Conover W (1999) Practical Nonparametric Statistics. John Wiley & Sons, New York
- Corti M, Crosetti D (1996) Geographic variation in the grey mullet: a geometric morphometric analysis using partial warp scores. Journal of fish biology 48 (2):255-269

- Costa C, Aguzzi J, Menesatti P, Antonucci F, Rimatori V, Mattoccia IM (2008) Shape analysis of different populations of clams in relation to their geographical structure. *Journal of zoology* 276 (1):71-80
- Côté IM (1995) Effects of predatory crab effluent on byssus production in mussels. *Journal of experimental marine biology ecology* 188 (2):233-241
- CRIAR (2012) Panorama de la Miticultura a nivel Mundial, Regional y Local. Disertación, 5° Taller de Trabajo de la RMCP y Taller de Cultivo de Mejillón
- Cruz RA, Villalobos CR (1993) Shell length at sexual maturity and spawning cycle of *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) from Costa Rica. *Revista de biología tropical*:89-92
- Cubillo AM, Peteiro LG, Fernández-Reiriz MJ, Labarta U (2012a) Density-dependent effects on morphological plasticity of *Mytilus galloprovincialis* in suspended culture. *Aquaculture* 338:246-252
- Cubillo AM, Peteiro LG, Fernández-Reiriz MJ, Labarta U (2012b) Influence of stocking density on growth of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in suspended culture. *Aquaculture* 342:103-111

D

- Dahlbäck B, Gunnarsson L (1981) Sedimentation and sulfate reduction under a mussel culture. *Marine biology* 63 (3):269-275
- Dahlhoff EP, Menge BA (1996) Influence of phytoplankton concentration and wave exposure on the ecophysiology of *Mytilus californianus*. *Marine ecology progress series* 144:97-107
- De la Torre F, Pascual MS, Barón PJ (2007) Feeding physiology of the Argentine mussel *Mytilus edulis platensis* (d'Orbigny, 1846): does it feed faster in suspended culture system? *Aquaculture international* 15 (6):415
- Denny M, Wetthey D (2001) Physical processes that generate patterns in marine communities. *Marine community ecology*:3-37
- DeWitt TJ, Sih A, Wilson DS (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in ecology evolution* 13 (2):77-81
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C (2012) InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Dixon D, Cava-Sole A, Pascoe P, Holland P (1995) Periostracal adventitious hairs on spat of the mussel *Mytilus edulis*. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom* 75 (2):363-372
- Dobigny G, Baylac M, Denys C (2002) Geometric morphometrics, neural networks and diagnosis of sibling *Taterillus* species (Rodentia, Gerbillinae). *Biological journal of the linnean society* 77 (3):319-327
- Dongen S (2006) Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *Journal of evolutionary biology* 19 (6):1727-1743
- Drake AG, Klingenberg CP (2010) Large-scale diversification of skull shape in domestic dogs: disparity and modularity. *The american naturalist* 175 (3):289-301
- Dryden I, Mardia K (1998) Statistical analysis of shape. Wiley

Dumbauld BR, Ruesink JL, Rumrill SS (2009) The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. *Aquaculture* 290 (3-4):196-223

E

Escoufier Y (1973) Le traitement des variables vectorielles. *Biometrics*:751-760

Espiñeira M, Vieites JM, Santaclara FJ (2009) Development of a genetic method for the identification of salmon, trout, and bream in seafood products by means of PCR–RFLP and FINS methodologies. *European food research technology* 229 (5):785-793

F

FAO (2018) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, Roma

FAO/OMS (2005) Codex Alimentarius, Alimentos producidos orgánicamente. Roma

Fernández-Tajes J, Freire R, Méndez J (2010) A simple one-step PCR method for the identification between European and American razor clams species. *Food chemistry* 118 (4):995-998

Fernández-Tajes J, Longa A, García-Gil J, Chiu Y-W, Huang Y-S, Méndez J, Lee R-S (2011) Alternative PCR–RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. *European food research technology* 233 (5):791

Ferson S, Rohlf FJ, Koehn RK (1985) Measuring shape variation of two-dimensional outlines. *Systematic biology* 34 (1):59-68

Fischer G, Fisher BJZ (2013) A revision of *Pheidole* Westwood (Hymenoptera: Formicidae) in the islands of the Southwest Indian Ocean and designation of a neotype for the invasive *Pheidole megacephala*. *Zootaxa* 3683 (4):301-356

Fisher RA (1935) The logic of inductive inference. *Journal of the royal statistical society* 98 (1):39-82

Francoy TM, Grassi ML, Imperatriz-Fonseca VL, de Jesús May-Itzá W, Quezada-Euán JJG (2011) Geometric morphometrics of the wing as a tool for assigning genetic lineages and geographic origin to *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini). *Apidologie* 42 (4):499

Fréchette M, Bourget E (1985) Energy flow between the pelagic and benthic zones: factors controlling particulate organic matter available to an intertidal mussel bed. *Canadian journal of fisheries aquatic sciences* 42 (6):1158-1165

Fréchette M, Butman CA, Geyer WR (1989) The importance of boundary-layer flows in supplying phytoplankton to the benthic suspension feeder, *Mytilus edulis* L. *Limnology oceanography* 34 (1):19-36

Fuentes J, Gregorio V, Giráldez R, Molares J (2000) Within-raft variability of the growth rate of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, cultivated in the Ria de Arousa (NW Spain). *Aquaculture* 189 (1-2):39-52

Funk A, Reckendorfer W (2008) Environmental heterogeneity and morphological variability in *Pisidium subtruncatum* (Sphaeriidae, Bivalvia). International Review of hydrobiology 93 (2):188-199

G

Gardner JP, Thompson RJ (2009) Influence of genotype and geography on shell shape and morphometric trait variation among North Atlantic blue mussel (*Mytilus* spp.) populations. Biological journal of the linnean society 96 (4):875-897

Gardner RJ (1995) Geometric tomography, vol 58. Cambridge University Press Cambridge

Gascoigne JC, Beadman HA, Saurel C, Kaiser MJ (2005) Density dependence, spatial scale and patterning in sessile biota. Oecologia 145 (3):371-381

Gérard K, Bierne N, Borsa P, Chenuil A, Féral J-P (2008) Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. Molecular phylogenetics evolution 49 (1):84-91

Gil MN, Giarratano E, Barros V, Bortolus A, Codignotto JO, Schenke RD, Góngora GME, Lovrich G, Monti AJ, Pascual M (2019) Southern Argentina: The Patagonian Continental Shelf. En: World Seas: an Environmental Evaluation. Sheppard C (ed) Academic press, pp 783-811

Glasby T, Connell S (2001) Orientation and position of substrata have large effects on epibiotic assemblages. Marine ecology progress series 214:127-135

Goodall C (1991) Procrustes methods in the statistical analysis of shape. Journal of the royal statistical society: Series B 53 (2):285-321

Gosling E (2003) Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Blackwell, Oxford, England

Graham JH, Freeman DC, Emlen JM (1993) Developmental stability: a sensitive indicator of populations under stress. En: Environmental toxicology and risk assessment. ASTM International

Graham JH, Raz S, Hel-Or H, Nevo E (2010) Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications. Symmetry 2 (2):466-540

Grant J, Hatcher A, Scott DB, Pocklington P, Schafer C, Winters G (1995) A multidisciplinary approach to evaluating impacts of shellfish aquaculture on benthic communities. Estuaries 18 (1):124-144

Grefsrud ES, Strand Ø (2006) Comparison of shell strength in wild and cultured scallops (*Pecten maximus*). Aquaculture 251 (2-4):306-313

Griffiths C, Griffiths R (1987) Bivalvia. En: Bivalvia through Reptilia. Elsevier, pp 1-88

Guiñez R (1996) Dinámica poblacional del chorito maico, *Perumytilus purpuratus* (Lamarck 1819)(Bivalvia: Mytilidae), en gradientes de exposición al oleaje. Tesis doctoral, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile

H

- Hawkins AJS, Bayne BL (1992) Physiological interrelations, and the regulation of production. En: The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Gosling E (ed) Amsterdam: Elsevier science publishers pp. 171–222
- Hernández-Moresino RD, Crespi-Abril AC, Soria G, Sánchez A, Isla F, Barón PJ (2019) Inferring bottom circulation based on sediment pattern distribution in the San José Gulf, Patagonia Argentina. *Journal of south american earth sciences* 89:189-196
- Hilbish TJ, Mullinax A, Dolven SI, Meyer A, Koehn RK, Rawson PD (2000) Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. *Marine biology* 136 (1):69-77
- Holloway M, Connell S (2002) Why do floating structures create novel habitats for subtidal epibiota? *Marine ecology progress series* 235:43-52
- Hosken D, Blanckenhorn W, Ward P (2000) Developmental stability in yellow dung flies (*Scathophaga stercoraria*): fluctuating asymmetry, heterozygosity and environmental stress. *Journal of evolutionary biology* 13 (6):919-926
- Hotelling H (1933) Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of educational psychology* 24 (6):417
- Hulscher SJ (1996) Tidal-induced large-scale regular bed form patterns in a three-dimensional shallow water model. *Journal of geophysical research: Oceans* 101 (C9):20727-20744

I

- Ibañez AL, Cowx IG, O'higgins P (2007) Geometric morphometric analysis of fish scales for identifying genera, species, and local populations within the Mugilidae. *Canadian journal of fisheries aquatic sciences* 64 (8):1091-1100
- Ihssen P, Booke H, Casselman J, McGlade J, Payne N, Utter F (1981) Stock identification: materials and methods. *Canadian journal of fisheries aquatic sciences* 38 (12):1838-1855
- Illesca A, Oyarzún PA, Toro JE, Gardner JP (2018) Morphometric variability of smooth-shelled blue mussels from the Pacific coast of South America. *Biological journal of the linnean society* 125 (1):194-209
- Innes D, Bates J (1999) Morphological variation of *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* in eastern Newfoundland. *Marine biology* 133 (4):691-699

J

- Johnson R, Wichern D (1998) Principal components. *Applied multivariate statistical analysis* 6:430-481

K

- Kaspar H, Gillespie P, Boyer I, MacKenzie A (1985) Effects of mussel aquaculture on the nitrogen cycle and benthic communities in Kenepuru Sound, Marlborough Sounds, New Zealand. *Marine biology* 85 (2):127-136
- Kautsky H, Van der Maarel E, Van der Maarel E (1990) Multivariate approaches to the variation in phytobenthic communities and environmental vectors in the Baltic Sea. *Marine ecology progress series*:169-184
- Kendall DG (1984) Shape manifolds, procrustean metrics, and complex projective spaces. *Bulletin of the london mathematical society* 16 (2):81-121
- Kirk M, Esler D, Boyd WS (2007) Morphology and density of mussels on natural and aquaculture structure habitats: implications for sea duck predators. *Marine ecology progress series* 346:179-187
- Klingenberg C (2015) Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry* 7 (2):843-934
- Klingenberg CP (2003) Developmental instability as a research tool: using patterns of fluctuating asymmetry to infer the developmental origins of morphological integration. En: *Developmental instability: causes consequences*:427-442
- Klingenberg CP (2008) Morphological integration and developmental modularity. *Annual review of ecology, evolution, systematics* 39:115-132
- Klingenberg CP (2009) Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: tools for evaluating a priori hypotheses. *Evolution & Development* 11:405-421
- Klingenberg CP (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources* 11 (2):353-357
- Klingenberg CP (2014) Studying morphological integration and modularity at multiple levels: concepts and analysis. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences* 369 (1649):20130249
- Klingenberg CP (2016) Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development genes evolution* 226 (3):113-137
- Klingenberg CP, Badyaev AV, Sowry SM, Beckwith NJ (2001) Inferring developmental modularity from morphological integration: analysis of individual variation and asymmetry in bumblebee wings. *The american naturalist* 157 (1):11-23
- Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A (2002) Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56 (10):1909-1920
- Klingenberg CP, Marugán-Lobón J (2013) Evolutionary covariation in geometric morphometric data: analyzing integration, modularity, and allometry in a phylogenetic context. *Systematic biology* 62 (4):591-610
- Klingenberg CP, McIntyre GS (1998) Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52 (5):1363-1375

- Klingenberg CP, McIntyre GS, Zaklan SD (1998) Left–right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proceedings of the royal society of London series B: Biological sciences* 265 (1402):1255-1259
- Kraeuter JN, Castagna M (2001) *Biology of the hard clam*, vol 31. Elsevier
- Krapivka S, Toro JE, Alcapán AC, Astorga M, Presa P, Pérez M, Guiñez R (2007) Shell-shape variation along the latitudinal range of the Chilean blue mussel *Mytilus chilensis* (Hupe 1854). *Aquaculture research* 38 (16):1770-1777

L

- La Rosa T, Mirto S, Mazzola A, Danovaro R (2001) Differential responses of benthic microbes and meiofauna to fish-farm disturbance in coastal sediments. *Environmental pollution* 112 (3):427-434
- Labarta U, Fernández-Reiríz MJ, Babarro JM (1997) Differences in physiological energetics between intertidal and raft cultivated mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine ecology progress series* 152:167-173
- Lafrance M, Cliche G, Haugum GA, Guderley H (2003) Comparison of cultured and wild sea scallops *Placopecten magellanicus*, using behavioral responses and morphometric and biochemical indices. *Marine ecology progress series* 250:183-195
- Lajus D, Katolikova M, Strelkov P, Hummel H (2015) Fluctuating and directional asymmetry of the blue mussel (*Mytilus edulis*): improving methods of morphological analysis to explore species performance at the northern border of its range. *Symmetry* 7 (2):488-514
- Larraín MA, Díaz NF, Lamas C, Uribe C, Araneda C (2014) Traceability of mussel (*Mytilus chilensis*) in southern Chile using microsatellite molecular markers and assignment algorithms. *Exploratory survey. Food research international* 62:104-110
- Larraín MA, Díaz NF, Lamas C, Vargas C, Araneda C (2012) Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile. *Latin american journal of aquatic research* 40 (4):1077-1084
- Larraín MA, Zbawicka M, Araneda C, Gardner JP, Wenne R (2018) Native and invasive taxa on the Pacific coast of South America: Impacts on aquaculture, traceability and biodiversity of blue mussels (*Mytilus* spp.). *Evolutionary applications* 11 (3):298-311
- Lauzon-Guay J-S, Hamilton DJ, Barbeau MA (2005) Effect of mussel density and size on the morphology of blue mussels (*Mytilus edulis*) grown in suspended culture in Prince Edward Island, Canada. *Aquaculture* 249 (1-4):265-274
- Leamy L (1984) Morphometric studies in inbred and hybrid house mice. V. Directional and fluctuating asymmetry. *The american naturalist* 123 (5):579-593
- Leamy LJ, Klingenberg CP (2005) The genetics and evolution of fluctuating asymmetry. *Annual Review of Ecology, Evolution and systematics* 36:1-21
- Leichter JJ, Witman JD (1997) Water flow over subtidal rock walls: relation to distributions and growth rates of sessile suspension feeders in the Gulf of Maine Water flow and growth rates. *Journal of experimental marine biology and ecology* 209 (1-2):293-307

- Leonard GH, Bertness MD, Yund PO (1999) Crab predation, waterborne cues, and inducible defenses in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Ecology* 80 (1):1-14
- Levinton JS (2001) Genetics, paleontology, and macroevolution. Cambridge University Press
- Lovatelli A, Farias A, Uriarte I (2008) Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, 20-24 de agosto de 2007. Puerto Montt, Chile
- Lucas A, Beninger PG (1985) The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44 (3):187-200

M

- MacLean J, Evans D (1981) The stock concept, discreteness of fish stocks, and fisheries management. *Canadian journal of fisheries aquatic sciences* 38 (12):1889-1898
- Manly BF (1986) Randomization and regression methods for testing for associations with geographical, environmental and biological distances between populations. *Researches on population ecology* 28 (2):201-218
- Mann RA comparison of morphometric, biochemical, and physiological indexes of condition in marine bivalve molluscs. En: *Energy and Environmental Stress in Aquatic Systems, Selected Papers from a Symposium, held at Augusta, Georgia November 2-4, 1977. CONF-771114. p 484-497, 1978. 2 tab, 54 ref. NOAA 04-6-158-44106., 1978.*
- Mardia KV, Bookstein FL, Moreton IJ (2000) Statistical assessment of bilateral symmetry of shapes. *Biometrika*:285-300
- Markow TA (1995) Evolutionary ecology and developmental instability. *Annual review of entomology* 40 (1):105-120
- Márquez F, Adami ML, Trovant B, Nieto-Vilela RA, González-José R (2018) Allometric differences on the shell shape of two scorched mussel species along the Atlantic South American Coast. *Evolutionary ecology* 32 (1):43-56
- Márquez F, Averbuj A (2017) Sexual dimorphism in the shell of a nassariid gastropod. A 3D geometric morphometrics approach. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom* 97 (2):249-255
- Márquez F, Frizzera AC, Vázquez N (2017a) Environment-specific shell shape variation in the boring mytilid *Leiosolenus patagonicus*. *Marine biology research* 13 (2):246-252
- Márquez F, Robledo J, Peñaloza GE, Van der Molen S (2010) Use of different geometric morphometrics tools for the discrimination of phenotypic stocks of the striped clam *Ameghinomya antiqua* (Veneridae) in north Patagonia, Argentina. *Fisheries research* 101 (1-2):127-131
- Márquez F, Trivellini MM, Van der Molen S (2017b) Use of shell shape variation as an assessment tool in the southernmost razor clam fishery. *Fisheries research* 186:216-222
- Márquez F, Van Der Molen S (2011) Intraspecific shell-shape variation in the razor clam *Ensis macha* along the Patagonian coast. *Journal of molluscan studies* 77 (2):123-128
- Márquez F, Nieto-Vilela RA, Lozada M, Bigatti G (2015) Morphological and behavioral differences in the gastropod *Trophon geversianus* associated to distinct

- environmental conditions, as revealed by a multidisciplinary approach. *Journal of sea research* 95:239-247
- Matano R, Palma ED, Piola AR (2010) The influence of the Brazil and Malvinas Currents on the Southwestern Atlantic Shelf circulation. *Ocean science* 6: 983-995
- McDonald J, Seed R, Koehn R (1991) Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres. *Marine biology* 111 (3):323-333
- Mirto S, Danovaro R, Mazzola A (2000) Microbial and meiofaunal response to intensive mussel-farm biodeposition in coastal sediments of the western Mediterranean. *Marine pollution bulletin* 40 (3):244-252
- Moeser GM, Carrington E (2006) Seasonal variation in mussel byssal thread mechanics. *Journal of experimental biology* 209 (10):1996-2003
- Monteiro LR (1999) Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic biology* 48 (1):192-199
- Monteiro LR, Bonato V, Dos Reis SF (2005) Evolutionary integration and morphological diversification in complex morphological structures: mandible shape divergence in spiny rats (Rodentia, Echimyidae). *Evolution development* 7 (5):429-439
- Moschino V, Bressan M, Cavaleri L, Da Ros L (2015) Shell-shape and morphometric variability in *Mytilus galloprovincialis* from micro-tidal environments: responses to different hydrodynamic drivers. *Marine ecology* 36 (4):1440-1453
- Mosimann JE (1970) Size allometry: size and shape variables with characterizations of the lognormal and generalized gamma distributions. *Journal of the american statistical association* 65 (330):930-945
- Mueller KW (1996) A Preliminary Study of the Spatial Variation in Growth of Raft-Cultured Blue Mussels *Mytilus trossulus* in Northern Puget Sound, Washington. *Journal of the world aquaculture society* 27 (2):240-246

N

- Navarrete SA, Menge BA (1996) Keystone predation and interaction strength: interactive effects of predators on their main prey. *Ecological monographs* 66 (4):409-429
- Newell RI, Koch EW (2004) Modeling seagrass density and distribution in response to changes in turbidity stemming from bivalve filtration and seagrass sediment stabilization. *Estuaries* 27 (5):793-806
- Norberg J, Tedengren M (1995) Attack behaviour and predatory success of *Asterias rubens* L. related to differences in size and morphology of the prey mussel *Mytilus edulis* L. *Journal of experimental marine biology ecology* 186 (2):207-220

O

- Ogden R (2008) Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and fisheries* 9 (4):462-472
- Olson E, Miller R (1958) *Morphological Integration*. Chicago: Univ. Chicago Press

Orban E, Di Lena G, Navigato T, Casini I, Marzetti A, Caproni R (2002) Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. Food chemistry 77 (1):57-65

P

Palmer AR (1994) Fluctuating asymmetry analyses: a primer. En: Developmental instability: its origins and evolutionary implications. Springer, pp 335-364

Palmer AR, Strobeck C (1986) Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. Annual review of ecology systematics 17 (1):391-421

Palmer M, Pons GX, Linde M (2004) Discriminating between geographical groups of a Mediterranean commercial clam (*Chamelea gallina* (L.): Veneridae) by shape analysis. Fisheries research 67 (1):93-98

Pearson K (1901) Principal components analysis. The London, Edinburgh, Dublin Philosophical Magazine Journal of Science 6 (2):559

Pearson K (1920) Notes on the history of correlation. Biometrika 13 (1):25-45

Penchaszadeh PE (1974) Ecología del mejillón *Mytilus platensis* d'Orb. de bancos circalitorales. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina

Peterson CH, Black R (1988) Density-dependent mortality caused by physical stress interacting with biotic history. The american naturalist 131 (2):257-270

Piersma T, Van Gils JA (2011) The flexible phenotype: a body-centred integration of ecology, physiology, and behaviour. Oxford University Press

Pigliucci M (2001) Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. JHU Press

Piola A, Avellaneda NM, Guerrero R, Jardón F, Palma E, Romero S (2010) Malvinas-slope water intrusions on the northern Patagonia continental shelf. Ocean science 6 (1):345

Prieto AS, Vasquez M, Ruiz LJ (1999) Dinámica energética del crecimiento en una población del mejillón *Perna perna* (Fllibrachia: Mytilidae) en el noreste del Estado Sucre, Venezuela. Revista de Biología Tropical:399-410

R

Raffaelli D, Hawkins S (1996) Ecology, Intertidal Chapman and Hall London

Raubenheimer D, Cook P (1990) Effects of exposure to wave action on allocation of resources to shell and meat growth by the subtidal mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Shellfish research 9:87-93

Rechimont M (2011) Patrón de distribución y abundancia de invertebrados bentónicos en costas del Golfo Nuevo. Tesis licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn Argentina

Reimer O, Tedengren M (1996) Phenotypical improvement of morphological defences in the mussel *Mytilus edulis* induced by exposure to the predator *Asterias rubens*. Oikos:383-390

- Reimer O, Tedengren M (1997) Predator-induced changes in byssal attachment, aggregation and migration in the blue mussel, *Mytilus edulis*. Marine and freshwater behaviour and physiology 30 (4):251-266
- Reiss H, Greenstreet SP, Sieben K, Ehrich S, Piet GJ, Quirijns F, Robinson L, Wolff WJ, Kröncke I (2009) Effects of fishing disturbance on benthic communities and secondary production within an intensively fished area. Marine ecology progress series 394:201-213
- Richtsmeier JT, Burke DeLeon V, Lele SR (2002) The promise of geometric morphometrics. American journal of physical anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists 119 (S35):63-91
- Robles C, Robb J (1993) Varied carnivore effects and the prevalence of intertidal algal turfs. Journal of experimental marine biology and ecology 166 (1):65-91
- Rohlf F (2017a) tpsUtil v. 1.74. Ecology & evolution and anthropology. Stony Brook University
- Rohlf FJ (2016) TPS Relw v.1.64. Ecology and evolution, SUNY at Stony Brook
- Rohlf FJ (2017b) TpsDig2 v.2.30. Ecology & evolution and anthropology. Stony Brook University
- Rohlf FJ, Marcus LF (1993) A revolution morphometrics. Trends in ecology & evolution 8 (4):129-132
- Rohlf FJ, Slice D (1990) Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. Systematic biology 39 (1):40-59
- Rosenthal PJ (1995) *Plasmodium falciparum*: effects of proteinase inhibitors on globin hydrolysis by cultured malaria parasites. Experimental parasitology 80 (2):272-281
- Rufino MM, Gaspar MB, Pereira AM, Vasconcelos P (2006) Use of shape to distinguish *Chamelea gallina* and *Chamelea striatula* (Bivalvia: Veneridae): linear and geometric morphometric methods. Journal of morphology 267 (12):1433-1440
- Rufino MM, Vasconcelos P, Pereira F, Fernández-Tajes J, Darriba S, Méndez J, Gaspar MB (2013) Geographical variation in shell shape of the pod razor shell *Ensis siliqua* (Bivalvia: Pharidae). Helgoland marine research 67 (1):49

S

- Sandner TM, Matthies D (2017) Fluctuating asymmetry of leaves is a poor indicator of environmental stress and genetic stress by inbreeding in *Silene vulgaris*. Ecological indicators 79:247-253
- Sanford E, Menge BA (2001) Spatial and temporal variation in barnacle growth in a coastal upwelling system. Marine ecology progress series 209:143-157
- Santaclara FJ, Espiñeira M, Cabado AG, Aldasoro A, Gonzalez-Lavín N, Vieites JM (2006) Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. Journal of agricultural food chemistry 54 (22):8461-8470
- Savoya V (2011) Mejillones *Mytilus* spp. del atlántico sudoccidental: ¿Nativos, exóticos o ambos?. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

- Savoya V, Otero JG, Schwindt E (2015) Toward a better understanding of the native–nonnative status of *Mytilus* mussels in the southwestern Atlantic: comparing pre-European middens and modern populations. *Journal of coastal research* 31 (3):742-748
- Savriama Y, Klingenberg CP (2011) Beyond bilateral symmetry: geometric morphometric methods for any type of symmetry. *BMC evolutionary biology* 11 (1):280
- Scalici M, Traversetti L, Spani F, Malafoglia V, Colamartino M, Persichini T, Cappello S, Mancini G, Guerriero G, Colasanti M (2017) Shell fluctuating asymmetry in the sea-dwelling benthic bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) as morphological markers to detect environmental chemical contamination. *Ecotoxicology* 26 (3):396-404
- Schlosser G, Wagner GP (2004) Modularity in development and evolution. University of Chicago Press
- Seed R (1968) Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis*. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom* 48 (3):561-584
- Seed R (1973) Absolute and allometric growth in the mussel, *Mytilus edulis* L. (Mollusca, Bivalvia). *Journal of molluscan studies* 40 (5):343-357
- Seed R (1980) A note on the relationship between shell shape and life habits in *Geukensia demissa* and *Brachidontes exustus* (Mollusca: Bivalvia). *J moll Des Stud* 46:293-299
- Seed R, Suchanek TH (1992) Population and community ecology of *Mytilus*. *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics culture* 25:87-170
- Selin H (2013) *Encyclopaedia of the history of science, technology, and medicine in non-western cultures*. Springer Science & Business Media
- SENASA (2013) <http://www.senasa.gov.ar/> Dirección de Inocuidad de Productos de la Pesca y de la Acuicultura
- SENASA (2018) www.argentina.gob.ar/senasa. Ministerio de Producción y Trabajo. Secretaria de Agroindustria
- Sénéchal J, Grant J, Archambault M-C (2008) Experimental manipulation of suspended culture socks: growth and behavior of juvenile mussels (*Mytilus* spp.). *Journal of shellfish research* 27 (4):811-827
- Shine R (1989) Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. *The quarterly review of biology* 64 (4):419-461
- Smith D, Crespi B, Bookstein F (1997) Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of ploidy and hybridization. *Journal of evolutionary biology* 10 (4):551-574
- Soda K, Slice D, Naylor G (2017) Artificial neural networks and geometric morphometric methods as a means for classification: A case-study using teeth from *C archarhinus* sp.(C archarhinidae). *Journal of morphology* 278 (1):131-141
- Stanley SM (1970) Relation of shell form to life habits of the Bivalvia (Mollusca) *Geological Society of America*, vol 125

- Steffani CN, Branch GM (2003) Growth rate, condition, and shell shape of *Mytilus galloprovincialis*: responses to wave exposure. Marine ecology progress series 246:197-209
- Stirling H, Okumuş İ (1994) Growth, mortality and shell morphology of cultivated mussel (*Mytilus edulis*) stocks cross-planted between two Scottish sea lochs. Marine biology 119 (1):115-123
- Swain DP, Foote CJ (1999) Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. Fisheries research 43 (1-3):113-128

T

- Telesca L, Michalek K, Sanders T, Peck LS, Thyrring J, Harper EM (2018) Blue mussel shell shape plasticity and natural environments: a quantitative approach. Scientific reports 8 (1):2865
- Tenore R (1982) Perspectives of research on detritus: do factors controlling the availability of detritus to macroconsumers depend on its source? Journal of marine research 40:473-490
- Thompson D (1915) Morphology and mathematics. Transactions of the Royal Society of Edinburgh 50:857-895
- Tirado C, Macías J (2006) Cultivo de mejillón—Aspectos generales y experiencias en Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, Andalucía, España
- Toro JE (1998) Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: the potential use in studies involving planktonic surveys. Journal of shellfish research 17:1203-1205
- Trancart M (1978) Biologie et possibilités d'exploitation de *Mytilus platensis* d'Orb. dans le golfe San José, péninsule Valdés, Argentine. These de Doctorat 3eme Cycle, Oceanologie, Univ. Aix Marseille II
- Trovant B, Márquez F, del Río C, Ruzzante DE, Martínez S, Orensanz JM (2018) Insights on the history of the scorched mussel *Brachidontes rodriguezii* (Bivalvia: Mytilidae) in the Southwest Atlantic: a geometric morphometrics perspective. Historical biology 30 (4):564-572
- Turcotte MM, Levine JM (2016) Phenotypic plasticity and species coexistence. Trends in ecology evolution 31 (10):803-813

V

- Valdano SG, Di Rienzo J (2007) Discovering meaningful groups in hierarchical cluster analysis. An extension to the multivariate case of a multiple comparison method based on cluster analysis. InterStat:1-28
- Valen LV (1962) A study of fluctuating asymmetry. Evolution 16 (2):125-142
- Valladares A, Manríquez G, Suárez-Isla BA (2010) Shell shape variation in populations of *Mytilus chilensis* (Hupe 1854) from southern Chile: a geometric morphometric approach. Marine biology 157 (12):2731-2738

- Van den Brink V, Bokma F (2011) Morphometric shape analysis using learning vector quantization neural networks—an example distinguishing two microtine vole species. En: Annales Zoologici Fennici. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board vol 6, pp 359-365
- Van der Molen S, Márquez F, Idaszkin YL, Adami M (2013) Use of shell-shape to discriminate between *Brachidontes rodriguezii* and *Brachidontes purpuratus* species (Mytilidae) in the transition zone of their distributions (south-western Atlantic). Journal of the marine biological association of the United Kingdom 93 (3):803-808
- Vinuesa J (1979) Ciclo godanal y primera madurez sexual del mejillón patagónico *Mytilus edulis chilensis* Hupe, en Puerto Deseado. Contribución Científica 150 35-47

W

- Waldman JR (2005) Definition of stocks: an evolving concept. En: Stock identification methods. Elsevier, pp 7-16
- Westfall KM, Gardner JP (2013) Interlineage *Mytilus galloprovincialis* Lmk. 1819 hybridization yields inconsistent genetic outcomes in the Southern hemisphere. Biological Invasions 15 (7):1493-1506
- Westfall KMG, Jonathan P. (2010) Genetic diversity of Southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Mytilidae) and the identification of non-indigenous taxa. Biological journal of the Linnean society 101 (4):898-909
- Widdows J, Donkin P, Salkeld P, Cleary J, Lowe D, Evans S, Thomson P (1984) Relative importance of environmental factors in determining physiological differences between two populations of mussels (*Mytilus edulis*). Marine ecology progress series Oldendorf 17 (1):33-47
- Wieters EA, Navarrete SA (1998) Spatial variability in prey preferences of the intertidal whelks *Nucella canaliculata* and *Nucella emarginata*. Journal of experimental marine biology ecology 222 (1-2):133-148
- Willmore KE, Young NM, Richtsmeier JT (2007) Phenotypic variability: its components, measurement and underlying developmental processes. Evolutionary biology 34 (3-4):99-120
- Wonham MJ (2004) Mini-review: distribution of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) and hybrids in the Northeast Pacific. Journal of shellfish research 23 (2):535-544
- www.alimentosargentinos.gob.ar (2019) Ministerio de producción y Trabajo.
- www.AmiChile.com (2019) Asociación de Mitilicultores de Chile.
- www.argentina.gob.ar/agroindustria (2018) Ministerio de producción y trabajo. Secretaría de Agroindustria.
- www.giovanni.gsfc.nasa.gov/giovanni/ (2019) Nasa.
- www.hidro.gob.ar (2019) Servicio de hidrografía naval.
- Yusseppone MS, Márquez F, Luquet CM, Brey T, Ríos de Molina MC, Rocchetta I (2018) Does shell shape variation play a role in conservation of the long-lived freshwater bivalve *Diplodon chilensis* (Bivalvia, Hyriidae)? Ecohydrology 11 (2):e1931

Z

- Zaixso H, Boraso de Zaixso A. (2015) Recursos biológicos bentónicos: la Zona Costera Patagónica Argentina. Universitaria de la Patagonia, EDUPA, Comodoro Rivadavia
- Zar JH (1999) Biostatistical analysis. Pearson Education India
- Zbawicka M, Trucco MI, Wenne R (2018) Single nucleotide polymorphisms in native South American Atlantic coast populations of smooth shelled mussels: hybridization with invasive European *Mytilus galloprovincialis*. Genetics selection evolution 50 (1):5
- Zelditch M, Swiderski D, Sheets H, Fink W (2004) Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press London, United Kingdom
- Zieritz A, Aldridge DC (2011) Sexual, habitat-constrained and parasite-induced dimorphism in the shell of a freshwater mussel (*Anodonta anatina*, Unionidae). Journal of morphology 272 (11):1365-1375